

DARIO MACIEL HAUER

**EFEITO DA VITAMINA E NA FORMAÇÃO NEO-INTIMAL
PÓS-ANGIOPLASTIA EM MODELO EXPERIMENTAL
COM COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Cardiologia, do Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. **Álvaro Vieira Moura**

CURITIBA

1997



Ministério da Educação e do Desporto
Universidade Federal do Paraná
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CARDIOLOGIA

PARECER

PARECER CONJUNTO dos Professores Dr. **ALVARO VIEIRA MOURA**, Dr. **PROTÁSIO LEMOS DA DA LUZ**, Dr. **JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA** e Dr. **RONALDO DA ROCHA LOURES BUENO**, sobre a Dissertação de Mestrado em Cardiologia da Universidade Federal do Paraná, elaborada pelo Dr. **DARIO HAUER**, intitulada: **"EFEITO DA VITAMINA E NA FORMAÇÃO NEO-INTIMAL PÓS-ANGIOPLASTIA EM MODELO EXPERIMENTAL COM COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS"**.

Banca Examinadora considerou que o Dr. **DARIO HAUER** apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe **CONCEITO "A"**, sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **MESTRE EM CARDIOLOGIA** e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 13 de dezembro 1997.



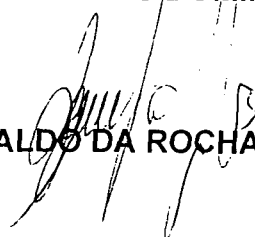
Prof. Dr. **ALVARO VIEIRA MOURA**



Prof. Dr. **PROTÁSIO LEMOS DA LUZ**



Prof. Dr. **JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA**



Prof. Dr. **RONALDO DA ROCHA LOURES BUENO**

A meus amores, minha doce Magali, e meu
pequeno filho Kevin.

A meus pais, sempre presentes nos
momentos fundamentais da minha vida

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Álvaro Vieira Moura , orientador desta dissertação, pela importância que sua contribuição trouxe a todas as fases deste trabalho - sendo mais que um orientador- um verdadeiro mestre no ensino da medicina e da ciência.

Ao Prof. João Carlos Repka, pela gentileza de ceder a infra-estrutura do Tecpar, assim como pelo seu auxílio fundamental no desenvolvimento do trabalho experimental.

À Profa. Dra. Lubomira Veronika Oliva pela orientação no estudo dos cortes histológicos e pela ajuda na confecção das lâminas.

Ao Dr. Julies Y. T. Lam, diretor do Laboratório de Trombose e Aterosclerose do “Montreal Heart Institute” e professor do Departamento de Medicina da Universidade de Montreal, Canadá, pela realização da planimetria digital dos cortes histológicos.

Ao Prof. Dr. Yedo Alquini, do Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas (UFPR), pelas fotografias dos cortes histológicos.

Ao Prof. Dr. Cláudio Pereira da Cunha, coordenador do Curso de Mestrado em Cardiologia

À Sra. Ângela da Matta Silveira Martins pela ajuda na feitura da análise estatística.

A meu pai, Lycio Hauer, que revisou a estrutura da língua portuguesa.

Ao meu amigo, Dr. Marcelo Freitas Santos, pelo constante incentivo.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigado

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE GRÁFICOS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XI
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 RADICAIS LIVRES.....	8
2.1.1 Conceitos.....	8
2.1.2 Formação dos Radicais Livres.....	9
2.1.3 Locais de Formação dos Radicais Livres.....	12
2.2 A REESTENOSE.....	14
2.2.1 Definição.....	14
2.2.2 Fisiopatologia da Reestenose.....	16

2.2.2.1 A Angioplastia como Lesão Arterial.....	16
2.2.2.2 O Papel da Trombose.....	17
2.2.2.3 A Cinética da Formação da Neo-íntima.....	20
2.2.2.4 Papel das Citoquinas e dos Fatores de Crescimento.....	23
2.2.3 Participação dos Radicais Livres na Reestenose.....	25
2.2.4 O Conceito de Estresse Oxidativo.....	26
2.2.5 Estresse Oxidativo e Reestenose.....	27
2.2.6 Outros Mecanismos Envolvidos na Reestenose.....	42
2.2.6.1 O Remodelamento Geométrico.....	42
3 MATERIAL E MÉTODO.....	45
3.1 MATERIAL DE EXPERIMENTAÇÃO - ANIMAIS E BIOTÉRIO.....	46
3.2 DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO.....	47
3.3 DOSAGENS SANGUÍNEAS.....	47
3.4 PREPARO DA RAÇÃO.....	48
3.5 CRIAÇÃO DAS LESÕES ARTERIAIS.....	49
3.6 ADMINISTRAÇÃO DA VITAMINA E E DA DIETA.....	49
3.7 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS.....	50
3.8 AVALIAÇÃO DAS LESÕES.....	50
3.9 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	51
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53

4 RESULTADOS.....	54
4.1 PESO DOS ANIMAIS.....	55
4.2 DOSAGENS BIOQUÍMICAS.....	56
4.2.1 Níveis de Colesterol Total.....	56
4.2.2 Níveis de triglicerídeos.....	58
4.2.3 Níveis de HDL e LDL.....	59
4.3 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DAS LESÕES ARTERIAIS.....	60
5 DISCUSSÃO.....	62
5.1 RESULTADOS DA ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS LESÕES.....	67
5 CONCLUSÃO.....	75
ANEXOS.....	77
ANEXO 1 - VALORES PLANIMÉTRICOS DAS LESÕES ARTERIAIS.....	78
ANEXO 2 - VALORES DA ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	81
ANEXO 3 - RESULTADOS ESTATÍSTICOS.....	83
ANEXO 4 - FIGURAS.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PESO DOS ANIMAIS (g) NO INÍCIO DO EXPERIMENTO.....	55
TABELA 2 - PESO DOS ANIMAIS (g) NO FINAL DO EXPERIMENTO.....	56
TABELA 3 - COLESTEROL SÉRICO (mg/dl) DOS ANIMAIS.....	57
TABELA 4 - TRIGLICERÍDEOS (mg/dl) SÉRICOS DOS ANIMAIS.....	58
TABELA 5 - NÍVEIS DE HDL (mg/dl).....	59
TABELA 6 - NÍVEIS DE LDL (mg/dl).....	60
TABELA 7- VALOR PERCENTUAL (%) DAS ÁREAS (mm ²) DE NEO-ÍNTIMA EM RELAÇÃO A ÁREA DA MÉDIA (mm ²).....	61
TABELA 8 - VALORES PLANIMÉTRICOS DAS LESÕES (mm ²) DO GRUPO A....	79
TABELA 9 - VALORES PLANIMÉTRICOS DAS LESÕES (mm ²) DO GRUPO B....	80

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - PESO MÉDIO DO GRUPO A E DO GRUPO B.....	56
GRÁFICO 2 - COLESTEROL MÉDIO DO GRUPO A E DO GRUPO B.....	57
GRÁFICO 3 - TRIGLICERÍDEO MÉDIO DO GRUPO A E DO GRUPO B.....	58
GRÁFICO 4 - HDL MÉDIO DO GRUPO A E DO GRUPO B.....	59
GRÁFICO 5 - LDL MÉDIO DO GRUPO A E DO GRUPO B.....	60
GRÁFICO 6 - MÉDIA DOS VALORES DA NEO-ÍNTIMA DO GRUPO A E DO GRUPO B.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ	- ÁREA
$^-\text{O-O-N=O}$	- ÂNION PEROXINITRITO
O_2^\bullet	- RADICAL SUPERÓXIDO
ApoB	- APOLIPOPROTEÍNA B
bFGF	- “BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR”
BHT	- “BUTYLATED HYDROXYTOUENE”
C	- CARBONO
C¹⁴ - Tetracloreto	- TETRACLORETO MARCADO COM CARBONO 14
DNA	- ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
DP	- DESVIO PADRÃO
e	- ELÉTRON
FGF	- “FIBROBLAST GROWTH FACTOR”
FNT-α	- FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA
FRDE	- FATOR RELAXANTE DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO
FT	- FATOR TECIDUAL
GSH	- GLUTATION
GSSG	- DISSULFETO DE GLUTATION

H	- HIDROGÊNIO
H₂ O₂	- PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
HDL	- LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE
HO•	- RADICAL HIDROXILA
HO-O-N=O	- ÁCIDO PEROXINITRITO
IGF	- “INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR”
IL-1	- INTERLEUCINA 1
IX a	- FATOR NOVE ATIVADO
LDL	- LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE
m RNA	- ÁCIDO RIBONUCLÉICO MENSAGEIRO
MCP-1	- “MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN 1”
N	- NITROGÊNIO
N.H.L.B.I.	- “NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE”
O	- OXIGÊNIO
O₂	- OXIGÊNIO MOLECULAR
ON	- ÓXIDO NÍTRICO
oxi-apoA-1	- APOLIPOPROTEÍNA A-1 OXIDADA
oxi-LDL	- LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE OXIDADA
PCNA	- ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR
PDGF	- “PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR”

PDGF-B	- RECEPTOR DE PDGF B
PDGF-A	- RECEPTOR DE PDGF A
TF- m RNA	- ÁCIDO RIBONUCLÉICO MENSAGEIRO PARA FATOR TECIDUAL
TGF	- "TRANSFORMING GROWTH FACTOR"
VII a	- FATOR SETE ATIVADO
X a	- FATOR DEZ ATIVADO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. Coelho na caixa de fixação com as pinças comprimindo as artérias das orelhas.....	87
2. Visão posterior de dois coelhos nas caixas de fixação.....	87
3. Região dorsal da orelha do coelho, permitindo a visualização da circulação.....	88
4. Visão dos vasos da orelha por transiluminação.....	89
5. Pinças Kelly n. 16 comprimindo a artéria central da orelha em dois pontos (distal e proximal).....	90
6. Pinças Kelly n. 16 comprimindo a artéria central da orelha em dois pontos (distal e proximal), passados 30 min.....	91
7. Pinças Kelly n. 16 comprimindo a artéria central da orelha em dois pontos (distal e proximal), passados 30 min.....	92
8. Pinça sendo retirada após 30 minutos de compressão.....	93
9. Aspecto do dorso da orelha após 30 minutos de compressão.....	94
10. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do estudo piloto. (Tricrômico de Masson - 10X).....	95
11. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do estudo piloto. (Tricrômico de Masson - 40X).....	95
12. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do estudo piloto. (Van Gieson - 10).....	96
13. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do estudo piloto. (Van Gieson - 40x).....	96
14. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do grupo controle (B). (Van Gieson - 10).....	97

15. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do grupo controle (B). (Van Gieson - 40x).....	97
16. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do grupo controle (A). (Van Gieson - 10).....	98
17. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do grupo controle (A). (Van Gieson - 40x).....	98

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o efeito da vitamina E (acetato de DL- α tocoferol) na proliferação intimal pós-angioplastia, foi desenvolvido um experimento com dezesseis coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica a 1%. Os dezesseis coelhos foram divididos em dois grupos de oito animais. O primeiro grupo, chamado de Grupo A, foi alimentado com dieta aterogênica a 1% de colesterol, associada a 30mg/kg/dia de vitamina E, administrada diariamente. O segundo grupo (grupo controle), chamado de Grupo B, foi somente alimentado com dieta aterogênica a 1% de colesterol. Todos os animais permaneceram submetidos a suas respectivas dietas durante os trinta e seis dias em que durou o experimento. No décimo quinto dia, todos os animais foram submetidos ao procedimento de criação das lesões na artéria central de suas orelhas. Este procedimento constituiu-se de uma compressão externa sobre a artéria central durante trinta minutos. Foram provocadas quatro lesões em cada animal: duas (proximal e distal) em cada orelha. Após 21 dias do procedimento, colheram-se amostras de sangue para a dosagem dos níveis de colesterol sérico, triglicerídeos, HDL e LDL e os coelhos foram sacrificados com dose letal de anestésico. As lesões arteriais foram avaliadas usando-se planimetria digital dos cortes histológicos. Os resultados obtidos mostraram elevação dos níveis de colesterol total, de triglicerídeos, da HDL e da LDL nos dois grupos, sem diferença estatística. Os resultados da análise morfométrica das lesões demonstraram uma média de neo-íntima de 24,15% (em relação a camada média) no grupo tratado com vitamina E e de uma média de neo-íntima de 25,14% (em relação à camada média) no grupo controle, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,587$). Concluiu-se que a vitamina E (acetato de DL- α tocoferol na dose de 30mg/kg/dia) não modificou a formação neo-intimal pós-angioplastia neste modelo experimental.

ABSTRACT

This experiment was started to evaluate the effect of vitamin E (DL α -tocoferol acetate) on the neointimal proliferative response in rabbits fed with a hipercholesterolemic diet (cholesterol 1%). The rabbits were divided in two groups of eight. Both groups were fed with the antherogenic diet for 36 days. The first group (group A) was fed daily with the diet associated with vitamin E in a dosage of 30mg/Kg/day. The second group (group B) was fed only with the atherogenic diet. After 15 days all animals were submitted to the external compression or their ear's central arteries for thirty minutes in order to create the lesions. We produced four lesions in each animal, two in each ear (proximal and distal). After 21 days blood samples were taken to measure cholesterol, triglicerids, HDL and LDL. After that, the animals were sacrificed with a lethal dose of anesthetic. The histological cuts of the lesions were evaluated by digital planimetry. The results showed no statistical difference concerning the serical levels of cholesterol, triglicerids, HDL and LDL between groups. The morphometric analysis of the lesions showed no statistical difference of the mean values of neointimal proliferation between groups (group A=24,15% and group B=25,14%, $P=0,587\%$). We concluded that vitamin E (DL α -tocoferol acetate), in a dosage of 30mg/Kg/day, did not modify the neointimal proliferative response using this experimental model.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A doença coronária aterosclerótica é a principal causa de morte nos países ocidentais. Segundo o Centro Nacional para Estatística da Saúde (National Center For Health Statistics), nos Estados Unidos, cada ano, aproximadamente 5,4 milhões de pessoas são diagnosticadas como apresentando coronariopatia e mais de 550.000 mortes são atribuídas à aterosclerose coronária (ROSS, 1997). No Brasil, as doenças cardiovasculares também ocupam o primeiro lugar entre as causas de morte, vitimando aproximadamente 300.000 brasileiros por ano. As três primeiras capitais que apresentam maiores coeficientes de mortalidade por doença isquêmica são, em ordem decrescente, Porto Alegre, Rio de Janeiro e Curitiba (LOTUFO, 1996).

As diversas linhas de tratamento para a coronariopatia incluem o uso de medicamentos tais como : os nitratos, os betabloqueadores, os bloqueadores dos canais de cálcio e drogas anti-agregantes plaquetários, etc.. Recentemente, as terapias de reperfusão com trombolíticos contribuíram para modificar a mortalidade do infarto agudo do miocárdio (FLATHER,1996). Outras terapias não medicamentosas, também utilizadas para o tratamento das doenças coronárias, incluem a cirurgia de revascularização do miocárdio e a angioplastia transluminal coronária.

A angioplastia coronariana é a dilatação da artéria no local da lesão estenosante por meio de um cateter balão (ELIS, S.G., 1994). Este método foi iniciado por Charles Dotter e Malvin Judkins, em 1964, para tratar lesões ateroscleróticas obstrutivas de artérias periféricas (DOTTER & JUDKINS, 1964). Durante os dez anos que se sucederam à primeira experiência, a angioplastia foi abandonada, não só devido, em grande parte, à dificuldade de serem reproduzidos os resultados apontados por Dotter, como também face à ocorrência de complicações no local da punção. Em 1976, Gruentzig modificou o cateter periférico para possibilitar seu uso em artérias coronarianas e, após experiências iniciais em cães e em cadáveres humanos, realizou a primeira angioplastia transluminal coronariana em maio de 1977 (GRUENTZIG, 1978).

Por ser um método menos invasivo, não requerendo anestesia geral e nem circulação extracorpórea, a angioplastia coronária tornou-se um método alternativo à cirurgia de revascularização e seu uso aumentou exponencialmente nos últimos anos. Em 1990, foram realizados mais de 300.000 procedimentos nos Estados Unidos, e, em todo o mundo, mais de 500.000 em 1994, ampliando-se, assim, para cerca de 700.000 os procedimentos realizados em 1995 (NUNES et al., 1996; TANQUAY et al., 1984). No entanto, este método valioso vem encontrando alguns obstáculos tais como a isquemia aguda decorrente da oclusão coronariana total ou iminente, que ocorre em cerca de 4% a 8% dos casos (TANAJURA et al., 1994) e a reobstrução ou reestenose que limita o sucesso alcançado num primeiro momento, exigindo a repetição do procedimento, nos primeiros seis meses, em um

terço dos pacientes em média (LIMA & PORTUGUAL, 1995; NUNES & SOUSA, 1996).

A reestenose coronária pode ser definida angiograficamente como sendo o retorno da estenose, *no local previamente dilatado*, a um grau relativo igual ou superior a 50% da luz do vaso (LIMA & PORTUGUAL, 1995; NUNES & SOUSA, 1996). Convém ressaltar que estas medidas devem ser efetuadas em um período de 6 meses, para não criar confusão com a reoclusão precoce, que apresenta características clínicas e fisiopatológicas distintas.

Em todas as angioplastias realizadas, calcula-se que entre 15% a 20% dos pacientes necessitaram repetir o procedimento, sendo que de 5% a 8% deles foram submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica, devido à reestenose (LIMA & PORTUGUAL, 1995). Sem considerar os procedimentos repetidos, o impacto econômico necessário ao tratamento da reestenose, nos Estados Unidos, é da ordem de 1,5 bilhões de dólares por ano (LIMA & PORTUGUAL, 1995).

Na tentativa de encontrar uma solução para o problema da reestenose, vários métodos têm sido desenvolvidos, desde os mecânicos, como o aterótomo de Simpson (ANNEX et al., 1994), a aterectomia rotacional (rotablator) (REISHMEN & BUCHBINDER, 1994), a angioplastia coronariana com Laser-Excimer (AHMED & BITTL, 1994), as endopróteses coronárias (SERRUYS, 1997), a irradiação intra-coronária, até aqueles químicos: drogas antiproliferativas, antiocoagulantes, drogas anti-agregantes plaquetárias, drogas redutoras de colesterol e antioxidantes.

Atualmente, nenhum destes métodos isoladamente solucionou o problema (LIMA E PORTUGUAL, 1995).

Sabe-se que a injúria causada pelo balão durante a angioplastia provoca lesões do endotélio e da lâmina elástica interna, o que acarreta o aumento da disponibilidade de substratos lipídicos para peroxidação (AMELI et al., 1993; FREYSCHUSS et al., 1993). Diante destes fatos, há a possibilidade de as espécies reativas preexistentes nas lesões, ou formadas em resposta à injúria causada pelo balão, poderem influenciar o processo da reestenose, e serem prevenidas por agentes antioxidantes. Neste contexto, o baixo custo dessas drogas aliado a quase inexistência de efeitos colaterais e ao impacto econômico que este tipo de terapia causaria, torna a possibilidade da prevenção da reestenose com o uso de drogas antioxidantes bastante atraente (NUNES & SOUSA, 1996). Como será relatado na parte destinada à revisão bibliográfica desta dissertação, várias correntes de pesquisa, tanto experimentais como clínicas, têm sido desenvolvidas nos últimos anos para resolver em definitivo esta questão.

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da reestenose coronária são bastante complexos e não estão totalmente compreendidos até o momento, o que deve estar contribuindo para os fracassos observados com as terapias propostas recentemente (NUNES & SOUSA, 1996). Assim, uma revisão completa da sua fisiopatologia é de suma importância. Por isso, daremos maior destaque para a explicação destes mecanismos na parte destinada à revisão bibliográfica, do que para uma visão histórica e cronológica. Tal revisão, dividimos em três

partes: a primeira parte compõe-se da definição e de uma revisão da bioquímica dos radicais livres; a segunda, da definição e de uma revisão da fisiopatologia propriamente dita; e a terceira e última parte tratará do que se conhece sobre o papel dos radicais livres na resposta vascular à lesão.

Como descrito acima, a angioplastia transluminal coronária representou um verdadeiro avanço no tratamento dos doentes portadores de doença coronária obstrutiva. No entanto, a reestenose permanece sendo a principal limitação para esta modalidade terapêutica. Por essa razão é que desenvolvemos um experimento com o objetivo de analisar o **efeito da vitamina E na proliferação neo-intimal**, utilizando um método de reestenose experimental com coelhos hipercolesterolêmicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RADICAIS LIVRES

2.1.1 Conceitos

Define-se RADICAL LIVRE como sendo *átomo ou molécula, com um ou mais elétrons não pareados em sua órbita externa, que escaparam do sítio enzimático ativo nos quais foram gerados* (CHEESEMAN & SLATER, 1993; SMITH, 1996). O elétron não pareado confere ao elemento grande reatividade, tornando-o capaz de reagir *inespecificamente* com qualquer grupo de substâncias (lipídeos, glicídios e proteínas). Isto dependerá da disponibilidade dos diversos substratos e da concentração destes nos locais de formação dos radicais livres. Neste sentido, a presença do substrato e sua concentração é de suma importância na destrutibilidade dos radicais livres.

A sua natureza radical e a presença do elétron não pareado são, por convenção, representados graficamente, com um ponto no canto superior direito do nome do radical (SMITH, 1996). Exemplos: A^{\bullet} , Y^{\bullet} , OH^{\bullet}

Os radicais livres mais importantes do sistema biológico são os radicais derivados do oxigênio. Existem vários termos que podem causar confusão utilizados por biólogos e em publicações médicas com certa sinonímia, tais como:

oxiradicais, radicais livres de oxigênio ou diversos termos contendo as palavras “oxigênio” e “radical”. Visto que alguns elementos como os hidroperóxidos, metabólitos peróxido e epóxidos de lipídeos, contêm um grupo funcional de oxigênio quimicamente ativo e não são radicais, o termo mais preciso e que geraria menos confusão seria a denominação conjunta em *espécies reativas de oxigênio*.

2.1.2 Formação dos Radicais Livres (CHEESEMAM & SLATER, 1993; SMITH, 1996)

Os radicais livres podem ser formados basicamente de quatro maneiras:

1. Fissão homolítica.
2. Adição de radicais.
3. Transferência de elétrons.
4. Abstração de átomos

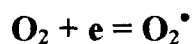
1º. A formação de radicais livres pela *fissão homolítica*, onde cada fragmento de molécula conserva um dos elétrons pareados, é bastante rara. Pelo fato de requerer grande quantidade de energia para romper com a ligação química, não costuma ocorrer fisiologicamente. Quando ocorre, é devido à exposição a altas temperaturas, à radiação ionizante ou à exposição à luz ultravioleta. Importante é diferenciar da *fissão heterolítica*, onde os dois elétrons pareados ficam com um dos

fragmentos, formando *íons*, e não radicais livres. Os radicais livres podem ser, também, íons com carga positiva, negativa ou eletricamente neutros.

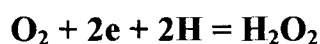
2°. A *adição de um radical* a uma molécula dá-se principalmente pela aderência covalente dos radicais às ligações duplas de carbono-carbono ($C=C$). O tetracloreto de carbono marcado com carbono 14 (C14-tetracloreto) é um metabólito ativo utilizado para estudar a interação de radicais com moléculas teciduais (SMITH, 1996). Observa-se que o C14-tetracloreto liga-se firmemente nas regiões de dupla ligação de carbono-carbono. Pode-se dizer que estas duplas ligações são estruturas alvos dos radicais. Este tipo de ligação encontra-se principalmente nos ácidos graxos não-saturados e colesterol teciduais. Esta característica explica em parte a razão pela qual os lipídios teciduais são alvos freqüentes e prováveis dos ataques de radicais livres. As proteínas também podem reagir com os radicais, mas parecem ser menos susceptíveis a sua ação, provavelmente por possuírem menos ligações duplas de carbono-carbono.

3°. A *transferência de elétrons* é a forma mais comum pela qual se formam radicais livres nos sistemas biológicos. Como já referido anteriormente, os radicais livres mais importantes são os radicais derivados do oxigênio, pela transferência de elétrons a moléculas de oxigênio. São formados continuamente nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático.

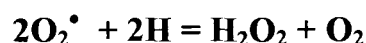
A transferência de um único elétron ao oxigênio molecular (O_2) resulta em um ânion *radical superóxido* ($O_2^{\bullet-}$):



A redução do oxigênio molecular com dois elétrons produzirá o *peróxido de hidrogênio* (H_2O_2).



Normalmente, no entanto, a reação de formação do peróxido de hidrogênio ocorre pela via do superóxido, onde duas moléculas de superóxido podem reagir para formar peróxido de hidrogênio e oxigênio (CHEESEMANN & SLATER, 1993):



A reação acima pode ocorrer de modo espontâneo muito lentamente, porém na presença da enzima *superóxido dismutase*, que catalisa o superóxido em peróxido de hidrogênio, esta reação se processa rapidamente (EHRENWALD et al, 1994; SMITH, 1996).

4°. Um quarto modo de formação de radicais livres é pela *abstração de átomos*. Mecanismo este envolvido na oxidação das lipoproteínas (COFFEY et al., 1995). É um mecanismo químico em que um radical abstrai, separa e absorve um átomo de hidrogênio de uma molécula orgânica, deixando o carbono com um

elétron não pareado. O exemplo clássico desta reação é a abstração de um átomo de hidrogênio metilênico bis-alílico dos ácidos graxos (CHEESEMANN & SLATER, 1993; HEBERLAND & SMITH, 1996). Nesta reação, o ácido graxo poliinsaturado transfere um átomo de hidrogênio, produzindo o radical *pentadienil*. Na presença de oxigênio molecular, o radical pentadienil incorpora o oxigênio e produz o radical *peroxil* ($O-O^{\bullet}$). O radical peroxil, por sua vez, transforma-se em *hidroperóxido* pela abstração de um átomo de hidrogênio de uma nova molécula orgânica. Se a nova molécula for um outro ácido graxo poliinsaturado, o radical então produzido pode propagar nova reação em cadeia até que seja interrompida pela depleção do substrato ou por uma etapa de término por um antioxidante natural (SMITH, 1996).

2.1.3 Locais de Formação dos Radicais Livres

No organismo, aproximadamente 95% do oxigênio segue a cadeia do citocromo mitocondrial e é metabolizado em água. Os 5% restantes transformam-se em espécies reativas de oxigênio, sendo elas: o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Esta redução biológica do oxigênio em água e dióxido de carbono é cuidadosamente controlada para minimizar a liberação de espécies do oxigênio parcialmente reduzidas na forma livre (LUZ & CHAGAS, 1993). Neste sentido, a alta eficiência da transferência de elétrons é garantida por um conjunto de enzimas como *superóxido dismutase* que catalisa a transformação do superóxido em peróxido de hidrogênio e a *glutation peroxidase* e *catalases* que

reduzem o peróxido de hidrogênio com a formação do dissulfeto de glutathione (GSSG). Porém estes mecanismos de defesa enzimática não são completamente eficientes, fazendo com que, em condições normais, a fonte principal de radicais livres nas células seja o escape da cadeia respiratória existente nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático (CHEESEMAN & SLATER, 1993). Uma das condições em que este escape pode ser favorecido, é quando a velocidade de produção das espécies reativas de oxigênio excede a capacidade dos mecanismos de defesa. A produção aumentada de superóxido é observada, por exemplo, em resposta à exposição de altas concentrações de oxigênio ou em resposta ao fluxo aumentado de elétrons em tensões de oxigênio normal (SMITH, 1996). Condição esta em que há uma saturação da regulação mitocondrial do fluxo de elétron e quebra do citocromo mitocondrial p450 (SMITH, 1993). Pelo fato de o superóxido dismutase estar presente em quase todos os compartimentos e de sua alta atividade, o superóxido tem sua ação limitada nos tecidos pela conversão deste em peróxido de hidrogênio. As concentrações de peróxido de hidrogênio, no entanto, também permanecem baixas pela ação das catalases e da glutathione peroxidase. Estas últimas reações produzem o dissulfeto de glutathione (GSSG). Os níveis celulares de dissulfeto de glutathione são mantidos bem abaixo das concentrações de glutathione (GSH) pela ação da enzima glutathione-redutase que reduz o GSSG em GSH e pelo transporte ativo do GSSG para fora das células. Neste sentido, a determinação e as medidas de GSSG nas células e nos tecidos extracelulares por métodos

altamente sensíveis, tornou-se um índice útil na determinação da exposição das células e tecidos às espécies reativas de oxigênio (SMITH, 1996).

O peróxido de hidrogênio, se não for reduzido totalmente pelos sistemas de defesa acima mencionados, pode se decompor em radical hidroxila, a mais reativa e lesiva das espécies reativas de oxigênio, particularmente na presença de íons de metais de transição, tais como o ferro e o cobre (CHEESEMAM & SLATER, 1993; SMITH, 1996). Esta reação é referida como reação de *Haber-Weiss*.

2.2 A REESTENOSE

2.2.1 Definição

A reestenose coronária pode ser definida de várias maneiras não existindo, na atualidade, nenhum consenso na literatura. Os critérios podem ser clínicos, fisiopatológicos ou angiográficos. Neste sentido, a melhor definição será aquela que melhor atenda aos objetivos propostos. Por exemplo, a reestenose pode ser definida clinicamente, como sendo um retorno aos sintomas clínicos de angina associados a alterações dos testes objetivos de isquemia. No entanto, esta definição pode subestimar um número considerável de pacientes que desenvolvem isquemia clinicamente silentes. Por estas razões, diversos trabalhos que avaliam a incidência, o comportamento e a identificação dos processos fisiopatológicos envolvidos na reestenose adotam como padrão a angiografia coronária. As

definições angiográficas são as mais prevalentes e, por esta razão, as mais controversas. Como muitas vezes a análise visual das angiografias são executadas por profissionais diferentes, a definição das lesões sofrem variações individuais. Várias publicações ilustram este problema (SCHWARTZ, 1995), demonstrando que existe em média uma superestimação de 15% a 20% na severidade das lesões em comparação com a angiografia quantitativa. Aumentando as dificuldades já existentes, as definições angiográficas, em sua maioria, anunciam a reestenose como um fenômeno dicotômico, dando a impressão de se tratar de um problema *que existe ou não existe*, do tipo tudo ou nada. Sabe-se que, em verdade, trata-se de um fenômeno quantitativo em que existe um processo contínuo de proliferação neo-intimal e de remodelamento vascular. Por isso, virtualmente todas as angiografias demonstram algum grau de estenose, além daquele observado no período imediato à angioplastia (MUSCUCCI & MULLER, 1996).

As definições angiográficas mais aceitas são (ELLIS et al.,1992; KASTRATI et al., 1993; LIMA & PORTUGUAL, 1995; KONSTADINIDIS, 1993):

1. aumento de, no mínimo, 30% no diâmetro da estenose no momento da angiografia de controle (National Heart, Lung and Blood Institute I. **NHLBI-I**);
2. um diâmetro de estenose de, no mínimo, 50% na pós-angioplastia que aumentou para maior ou igual a 70% na angiografia de controle (**NHLBI-II**);
3. aumento de 10% no diâmetro da estenose na angiografia de controle em relação ao diâmetro observado na pré-dilatação (**NHLBI-III**);

4. perda de, pelo menos, 50% do ganho luminal obtido imediatamente após a dilatação coronária (**NHLBI-IV**);

5. um aumento no diâmetro da estenose de menos de 50% depois da angioplastia para valores iguais ou superiores a 50% na angiografia de controle;

6. perda de 0,72mm no diâmetro luminal mínimo em relação ao obtido imediatamente após a dilatação.

Esta última definição está baseada na variabilidade do diâmetro luminal mínimo (em mm), obtido em duas observações diferentes, que é de 0,36. Esta variação corresponde a 1 desvio-padrão(1 DP). Se for utilizada esta medida, haverá um falso positivo calculado de 17,5%. Se utilizado 2 DP ($0,36+0,36=0,72\text{mm}$), haverá um falso-positivo de 2,5% (SERRUYS, 1988).

Apesar de não haver unanimidade com relação às definições aqui arroladas, existe uma tendência de se aceitar a quinta definição, talvez por ter esta maior correlação com eventos clínicos (NUNES & SOUSA, 1996).

2.2.2 Fisiopatologia da Reestenose

2.2.2.1 A Angioplastia como Lesão Arterial

A angioplastia coronariana pode ser considerada como uma lesão ou injúria provocada voluntariamente sobre a parede do vaso. Com a insuflação pelo cateter balão, o aumento da luz coronariana é alcançada às custas da compressão

da placa ateromatosa, mais rígida, sobre a parede vascular complacente. Disto resultam graus variados de fissuras, rasgaduras ou quebras da placa. Os mecanismos possíveis por meio da qual a angioplastia amplia a luz estenótica, podem, assim, ser resumidos:

- a. compressão mínima da placa ateromatosa;
- b. ruptura, quebra ou rasgadura da placa;
- c. distensão da artéria;
- d. estiramento da parede arterial no segmento livre de placa ateromatosa em lesões excêntricas;
- e. fratura, quebra ou rasgadura acompanhada de dissecação localizada.

2.2.2.2 O Papel da Trombose

Como a região subendotelial é rica em elementos pró-coagulantes, a presença do endotélio, estrategicamente colocado entre o sangue e as camadas mais profundas do vaso, previne a ativação dos fatores de coagulação e, deste modo, mantém a fluidez do sangue (LAURINDO & LUZ, 1994). A superfície do endotélio carregado negativamente repele as plaquetas com cargas negativas em sua superfície, impedindo a aproximação com eventuais elementos ativadores. No endotélio, também existem substâncias heparinóides que fixam a antitrombina III, formando um potente complexo que inibe a ação da trombina e dos fatores IXa e Xa. Outros mecanismos pelos quais o endotélio previne a coagulação são a

atividade do Fator Relaxante Dependente do Endotélio (FRDE), pelas prostaciclinas, ADPases, assim como pelo sistema da Proteína C - Trombomodulina (LUZ, 1996).

Deste modo, a lesão causada pela angioplastia interrompe o equilíbrio hemostático e a primeira resposta do vaso à agressão é a ativação e agregação plaquetária, seguida da formação de trombo mural. Observa-se que as plaquetas aderem espontaneamente nas regiões onde o endotélio está seriamente comprometido ou ausente . O exame pela angioscopia de 47 pacientes submetidos à angioplastia, demonstrou que aproximadamente 55% apresentaram graus variáveis de trombose mural e 58% de dissecação, sendo que em 41% havia a associação dos dois eventos (ITOH, 1995). A presença de pequenos depósitos de plaquetas e microtrombos também é observada em estudos experimentais e em necropsias (HANDIN & LASCALZO, 1991). A ativação e a agregação plaquetária, assim como a trombose mural, são iniciados por diversos fatores. A exposição ao colágeno e a fixação do fator de Von Willebrand pelo seu receptor GPIIb plaquetário permitem a adesão das plaquetas. A síntese de tromboplastina tissular ativa o fator VII da via extrínseca da coagulação, que, em seu turno, ativa o fator X. Outros fatores iniciadores são os componentes da própria placa, como o colesterol e os fosfolipídios. Do mesmo modo, o próprio processo de ativação plaquetária libera um conjunto de fatores plaquetários, o difosfato de adenosina e tromboxane A₂. Estes ocasionam a ativação de novas plaquetas em um círculo vicioso (HANDIN & LASCALZO, 1991).

A liberação de diversas substâncias durante a agregação plaquetária e a formação do trombo exercem efeitos diretos nas células musculares lisas e nas plaquetas, determinando um aumento na propensão ao vasoespasmo e à trombose. A disfunção endotelial, determinada pela ação lesiva do balão, caracteriza-se pela redução na síntese e liberação de substâncias vasodilatadoras e anti-trombogênicas, e pelo aumento na síntese e facilitação de substâncias vasoconstritoras e trombogênicas, induzindo resposta anormal à acetilcolina e à trombose. A participação da serotonina, que tem ação vasoconstritora na ausência do endotélio, provavelmente por esta determinar a liberação do FRDE (óxido nítrico), em conjunto com a ação vasoconstritora do tromboxane A_2 , contribuem para a trombose sobre a placa, determinado, muitas vezes, a obstrução aguda do vaso (CARVALHO et al., 1996).

O fator tecidual (FT) é uma glicoproteína ligada à membrana celular que, juntamente com o fator VII, formam um complexo protéico iniciador da via extrínseca da cascata da coagulação. O FT tem alta afinidade com o fator VII circulante, fazendo com que, uma vez formado o complexo, este desenvolva atividade proteolítica (VIIa), convertendo, desse modo, o fator X em Xa, determinando, em última etapa, a formação do agregado de fibrina e o trombo (HANDIN & LASCALZO, 1991). A presença deste fator tecidual na parede arterial não é uniforme. Estudos imunohistoquímicos demonstram que o antígeno de mRNA para o fator tecidual (TF-mRNA) é detectado na adventícia de uma variedade de artérias humanas, incluindo as artérias coronarianas, mamária interna e aorta. Em

contraste, o TF- mRNA não foi detectado no endotélio e a sua presença foi variável na média (MARMUR et al., 1993). No entanto, os valores de TF-mRNA aumentam rapidamente duas horas após a injúria em aorta de coelhos, demonstrando que a atividade do FT nas células musculares lisas é rapidamente induzida pela injúria vascular causada pelo balão, promovendo a iniciação e a propagação do trombo mural (MARMUR et al., 1993).

Outros produtos originados dos trombos plaquetários são certas citocinas e fatores de crescimento, tal como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) que, além de determinarem a migração de células musculares lisas da camada média para a íntima, ativam leucócitos e as próprias células musculares lisas, determinando a liberação de um conjunto de mediadores químicos como a interleucina-1(IL-1), o fator de necrose tumoral- α (FNT- α), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), e o fator de crescimento de fibroblastos (FCFb), que evocam nova atividade celular num ciclo de retroalimentação positiva auto-sustentada, acabando por colaborar na formação tardia de tecido neo-intimal (LIBBY, 1992).

2.2.2.3 A Cinética da Formação da Neo-íntima

Os efeitos da insuflação do cateter balão sobre as células musculares lisas das artérias e o subsequente desenvolvimento da neo-íntima são amplamente estudados em experimentos com animais (ASADA et al., 1996; SCOTT-BURDEN &

VANHOTTE,1993). Em um estudo realizado por Hanke e col. (1990), em que se avaliou a proliferação das células musculares lisas, utilizando-se método imunohistoquímico com *timidina* na determinação da síntese de DNA e anticorpo *anti- α -actina* na identificação das células musculares lisas, podemos observar a seqüência dos eventos celulares. Foram estudados 45 coelhos depois de produzida a placa ateromatosa por estímulos elétricos. Destes coelhos, 35 foram submetidos à angioplastia por balão. Na seqüência, foram avaliadas as alterações histológicas nos 3º, 7º, 14º, 21º e 42º dias depois da intervenção. Os eventos podem ser assim resumidos:

A. O controle (coelhos não submetidos à angioplastia) apresentou uma média de $12,7 \pm 4,8$ de células musculares lisas presentes na íntima e um índice de células em mitose de $0,8\% \pm 0,6\%$. Na camada média, o índice de mitoses foi de $0,3\% \pm 0,3\%$.

B. **Terceiro dia:** presença de 16 ± 9 de células musculares lisas na íntima com um aumento de $9,6\% \pm 4,6\%$ no índice de mitoses da íntima e $1,3\% \pm 1,8\%$ na média.

C. **Sétimo dia:** presença de 19 ± 9 células musculares lisas na íntima com um índice de mitose intimal de $8,4\% \pm 4\%$ e de $2,1\% \pm 2,1\%$ na média.

D. **14º dia:** presença de 23 ± 9 células musculares lisas na íntima com um índice de mitoses de $1,2\% \pm 0,5\%$. A média com índice de $1,1\% \pm 1,1\%$.

E. **21º dia**: presença na íntima de 25 ± 18 células musculares lisas com índice de mitoses de $1,1 \pm 0,5\%$. O índice de mitoses na média de $2,1 \pm 1,6\%$.

F. **28º dia**: presença de 33 ± 14 células musculares lisas na íntima com um índice de mitoses $0,3 \pm 0,2\%$. Observando-se na média um índice de mitoses de $0,5 \pm 0,4\%$.

G. **42º dia**: presença de 29 ± 14 células musculares lisas na íntima, um índice de mitoses de $0,2 \pm 0,1\%$, sendo que se observou, na média, um índice de mitoses de $0,3 \pm 0,2\%$

Sumarizando, houve um incremento significativo no número de células em fase de duplicação do DNA no período do 3º ao 7º dia, mantendo-se estável a partir deste dia. No entanto, distinto da proliferação intimal, houve um pequeno acréscimo na síntese da DNA da camada média até o 21º dia.

Em outro estudo imunohistoquímico realizado por Zeymer e col. (1992), onde foi estudada a proliferação das células musculares lisas em artéria aorta de ratos pelo Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), podemos observar uma sobreposição dos achados apontados no estudo anterior realizado por Henke e col. (1992), com a diferença de que neste estudo os cortes histológicos foram executados a partir do primeiro dia. Isto complementa as observações anteriores, adicionando a informação de que no primeiro dia o índice de mitoses, medidos pelo PCNA, era de $0,10 \pm 0,01\%$ e, no terceiro dia, de $4,2 \pm 0,2\%$ na camada média e de

0% na íntima. Neste trabalho, o sétimo dia também apresentou o maior índice de mitoses com $1,2 \pm 0,1\%$ na média e $46,0 \pm 4,4\%$ na íntima.

Segundo Schwartz e col. (1995), em um recente artigo de revisão, podem ser identificadas quatro fases de resposta proliferativa à injúria vascular. A primeira resposta proliferativa, denominada de primeira fase, que se inicia aproximadamente nas primeiras 24 horas, consiste na multiplicação das células musculares lisas na camada média. Em seguida, por volta de quarto dia, pode-se observar a passagem das células musculares lisas atravessando a lâmina limitante elástica interna, o que caracteriza a segunda fase. A duração desta fase não pode ser precisada, sabendo-se que, no entanto, depois desta passagem, inicia-se a terceira fase de multiplicação celular, que é a replicação no interior da camada íntima das células musculares lisas originárias da média. Este período pode durar de semanas a meses, havendo uma relativa quiescência nesta fase. No entanto, uma quarta fase de multiplicação intimal pode ser estimulada a partir de fatores químicos ou físicos (SAREMBOCK et al, 1994).

2.2.2.4 Papel das Citoquinas e dos Fatores de Crescimento

Vários compostos químicos têm sido estudados como mediadores das diferentes etapas do processo de reestenose (LIU et al., 1989; REIDY et al., 1992;

SCHWARTZ et al., 1995; BADIMON et al., 1993). Dentre os fatores estudados, destacam-se produtos da ativação das plaquetas e dos leucócitos, fatores de crescimento, moléculas de adesão e peptídeos inibidores do crescimento celular. Uma das explicações para a multiplicação observada em resposta à injúria, reside no fato de as células das paredes dos vasos serem capazes de se auto-estimularem. A observação de que células musculares lisas isoladas de animais jovens sintetizam e secretam mitógenos em cultura (LIBBY et al., 1992), e a descoberta posterior de que se tratava fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), levou à procura de diversos fatores responsáveis pela ativação e manutenção do processo replicativo (LIBBY et al., 1992).

Estudos experimentais têm demonstrado que a primeira fase de multiplicação que ocorre na média, sucede quase que totalmente em decorrência da liberação do fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) (SCHWARTZ et al., 1995). Embora o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) seja um poderoso mitógeno em células musculares lisas, experimentos realizados com infusão de PDGF têm demonstrado ser apenas um fraco mitógeno para células musculares lisas da camada média “in vivo”. Outros mediadores que têm alguma ação nesta fase são os antagonistas α -adrenérgicos e angiotensina II (RAKUGI et al., 1993; SCHWARTZ et al., 1995;).

A migração das células musculares lisas através da lâmina elástica limitante interna para formar a neo-íntima, que constitui a segunda fase, pode ser estimulada por um conjunto de moléculas tais como o PDGF, TGF- β , bFGF e

angiotensina II. O PDGF tem recebido maior atenção pelo fato de ser um poderoso mitógeno em células de cultura, demonstrando, no entanto, ter maior contribuição na *migração* (LIU et al., 1989).

Depois que as células musculares originadas da camada média se instalam na íntima, multiplicam-se por um período de semanas a meses. Apesar de não se poder identificar nenhum mitógeno principal nesta fase, há, porém, alguns compostos ativos. O receptor PDGF-A está presente nas células intimais de artérias lesadas. A ativação do receptor PDGF-B nas artérias de suínos determina um aumento expressivo da taxa de replicação. Outros mediadores da replicação celular que podem se expressar na neo-intima são o receptor AT-1 da angiotensina II, o TGF- β e o IGF-1 (SCHWARTZ et al., 1995; UCHIDA et al., 1996).

A replicação celular da neo-íntima pode ser novamente ativada, após um período de relativa quiescência, pela infusão de um conjunto de mitógenos, tais como o TGF- β , o bFGF e a angiotensina II (SCHWARTZ et al., 1995).

2.2.3 Participação dos Radicais Livres na Reestenose

O conjunto das evidências obtidas a partir de estudos experimentais e clínicos apóia o conceito atual de que alterações mediadas por radicais livres contribuem tanto para o início quanto para a progressão da aterosclerose, assim como desempenham um papel de suma importância na reestenose coronariana.

Evidências crescentes de que existem lipídeos e lipoproteínas oxidadas nas placas ateroscleróticas de animais de experimentação e de humanos, torna possível que a lesão provocada pelo cateter-balão determine um incremento da substratos lipídicos à peroxidação (LAFONT et al., 1995). Após a injúria pelo balão, observa-se que, no local dilatado, existe um aumento significativo de células inflamatórias que liberam elementos reativos de oxigênio e que, com um aumento da entrada de lipoproteínas do plasma, resultam em um incremento dos produtos da peroxidação lipídica. Estes produtos, por sua vez, podem estimular a replicação celular (LAFONT et al., 1995).

2.2.4 O Conceito de Estresse Oxidativo

O termo estresse oxidativo, utilizado freqüentemente em muitas publicações, não é uma expressão de significado muito preciso. No entanto, é uma expressão empregada com freqüência para categorizar quer uma diminuição da relação de glutathione (GSH) e dissulfeto de glutathione (GSSG), quer um aumento na produção de GSSG. Segundo Francisco Laurindo e Protásio da Luz (1996), em publicação recente, *estresse oxidativo ocorre quando os mecanismos de defesa são esgotados por excesso de produção de radicais livres ou quando tais mecanismos não são acessíveis ou não são eficientes para tamponar o efeito dessas espécies* (LAURINDO & LUZ, 1996). Portanto, ocorre estresse oxidativo quando ocorre qualquer desvio mensurável em um ou mais pares de redox para um

estado deficiente de elétrons (KEANEY & VITA, 1995). Os parâmetros mais freqüentemente utilizados para aferir o estresse oxidativo são as medidas das concentrações ou taxas teciduais de exportação de GSH e de GSSG (SMITH, 1996). A produção aumentada de GSSG é uma evidência razoável da produção também aumentada das espécies reativas de oxigênio. Acredita-se, ainda, que a medida do estresse oxidativo pode ser determinada por desvios nas relações de troca tiol/dissulfeto com grupos fundamentais de tióis de proteínas (PSH). Em equilíbrio químico, a fração de um determinado tiol protéico é convertido ao dissulfeto correspondente, PSSG, através da reação com o GSSG, e é fixada pela relação entre GSSG e GSH e pelo equilíbrio do par de redox ((KEANEY & VITA, 1995; LAURINDO & LUZ, 1996).

2.2.5 Estresse Oxidativo e Reestenose

O estresse oxidativo vascular pode influenciar o desenvolvimento da reestenose por basicamente quatro mecanismos :

1. *produção aumentada de radicais livres de oxigênio; a conseqüente, pela peroxidação lipídica;*
2. *aumento na formação de LDL oxidada, que estimula a liberação de elementos quimiotáticos e fatores de crescimentos nas células endoteliais, inibe a ação do óxido nítrico e é diretamente citotóxica;*

3. *inativação do óxido nítrico pelo ânion superóxido, reduzindo seu potencial antitrombótico e antiproliferativo;*

4. *ativação das plaquetas pelas espécies reativas de oxigênio, resultando liberação de fatores de crescimento.*

A reestenose pode ser favorecida pela ação de um ou mais destes mecanismos.

A reestenose coronária é um problema complexo que envolve vários mecanismos interligados. Deste modo, uma das respostas vasculares à injúria é o aumento na produção celular de espécies reativas de oxigênio. A capacidade de produção de radicais livres de oxigênio pelos vasos está bem demonstrada em um experimento realizado por Francisco Laurindo e Protásio da Luz (1991). Neste estudo, foi avaliado o papel dos elementos reativos de oxigênio na resposta vascular aguda à angioplastia. Foi provocada uma lesão em artérias normais de cães por insuflação de cateter-balão cerca de 50% acima do diâmetro basal. Após a angioplastia, houve uma vasoconstrição mantida e localizada nos cães do grupo controle (28,9% de redução do diâmetro basal). No grupo de cães tratados com superóxido dismutase, os diâmetros arteriais foram de 24% a 69% maiores do que os do controle. A extensão da trombose mural foi também reduzida nestes cães tratados com a superóxido dismutase. Porém, nenhum dos efeitos citados, inibição do vasoespasma e diminuição da trombose mural, foi observado nos outros três grupos manejados respectivamente com catalase, deferoxamina e 1,3 dimetil-2-tiouréia. Estes resultados, além de demonstrarem a liberação dos elementos

reativos de oxigênio, sugerem que o radical superóxido contribui para a vasoconstrição após angioplastia, assim como para a formação do trombo mural.

As evidências acima sugerem que o radical superóxido pode estar envolvido na degradação ou na inibição do efeito vasodilatador do fator relaxante dependente do endotélio (óxido nítrico). Evidências indiretas sugerem não somente a destruição do endotélio pela angioplastia, mas também que a própria placa aterosclerótica possui uma produção intrínseca maior de radical superóxido em comparação com vasos normais (FRANCISCHETTI et al., 1995; KEANEY et al., 1995; OHARA et al., 1993; TREASURE et al., 1995), fato este que, associado, poderia contribuir para uma maior tendência à reestenose depois de efetuada a angioplastia. Com o objetivo de verificar se as artérias ateromatosas produzem mais radical superóxido do que artérias normais, Ohara e col. (1993). desenvolveram um experimento com coelhos, medindo diretamente o radical superóxido pelo método de quimioimunofluorescência em artérias de coelhos normais e de coelhos hipercolesterolêmicos. As artérias dos coelhos hipercolesterolêmicos produziram aproximadamente três vezes mais radicais superóxidos ($1,73\text{nM/mg tecido/min}$ $m=8$ vs. $0,52\text{nM/mg tecido/min}$ $n=8$, $P= 0,001$) do que as artérias normais. Porém, quando foi acrescentado um inibidor da xantina oxidase, o oxipurinol, houve normalização dos níveis de radical superóxido produzidos pelos vasos hipercolesterolêmicos. Uma observação adicional foi possível pela retirada do endotélio antes das dosagens, verificando-se que nas artérias hipercolesterolêmicas os valores de radical superóxido retornam à

normalidade, enquanto que, nas artérias normais, a dosagem não foi alterada (OHARA et al., 1993). Outro experimento demonstra que a produção aumentada de radical superóxido pode ser prevenida pela administração de probucol (KEANEY et al., 1995).

A partir destes dados, pode-se concluir que:

- elementos reativos de oxigênio, notadamente o radical superóxido, são liberados durante a angioplastia (KEANEY et al., 1995; LAURINDO et al., 1991; OHARA et al., 1993);
- o endotélio das placas ateroscleróticas tem produção aumentada de radical superóxido (KEANEY et al., 1995; OHARA et al., 1993; DAUGHERTY et al., 1994);
- estes radicais podem degenerar o óxido nítrico e, desta forma, impedir sua ação vasodilatadora e antitrombótica (ANDERSON et al., 1995; KEANEY et al., 1995; OHARA et al., 1993);
- finalmente, que a formação destes elementos podem ser prevenidas por antioxidantes (KEANEY et al., 1995; LAURINDO et al., 1991; OHARA et al., 1993).

Pelo fato de a própria placa ateromatosa ter uma produção maior de radicais livres e pela possibilidade de estes radicais, liberados durante a angioplastia, influenciarem o transcurso da reestenose, faremos uma revisão da patogênese da aterosclerose.

A patogênese da aterosclerose é marcada por um acúmulo focal de macrófagos, células musculares lisas, de matriz extracelular e pelo depósito intra e extracelular de colesterol derivado de lipoproteínas na região sub-intimal (ESTERBAUER et al., 1993; REAVEN et al., 1993). A seqüência de eventos celulares foi amplamente estudada em animais de experimentação, com hipercolesterolemia induzida por dieta (ESTERBAUER et al., 1993). Atualmente, aceita-se que o evento celular mais precoce observado seja a aderência de monócitos ao endotélio vascular (ESTERBAUER et al., 1993; KEANEY & VITA, 1995; PRASAD & KALRA, 1993; ROSS & GLOMSET, 1976).

Segundo Schwartz C. J. (1993), em artigo de revisão, existe um consenso em relação ao mecanismo inicial da aterosclerose, podendo ser resumido da seguinte forma (SCHWARTZ, 1993) :

- influxo focal de lipoproteínas e acúmulo das mesmas nos sítios propensos a desenvolver placas ateroscleróticas;
- produção de espécies reativas de oxigênio ou radicais livres pelas células musculares lisas, macrófagos e células endoteliais (DAUGHERTY et al., 1994);
- modificação oxidativa das lipoproteínas presentes na camada sub-endotelial por espécies reativas de oxigênio, produzindo a chamada oxi-LDL e oxi-Lp(a);

- formação das células espumosas, dada a absorção das lipoproteínas oxidadas pelos macrófagos por meio dos receptores “scavenger” (HAMILTON et al., 1995);

- necrose das células espumosas, provavelmente devido ao efeito citotóxico da LDL oxidada, formando o núcleo lipídico da placa aterosclerótica. Este fato determina uma mudança significativa de estrias gordurosas, reversíveis, para placas ateroscleróticas mais avançadas, menos reversíveis;

- migração de células musculares lisas para a região subendotelial e sua posterior multiplicação. O fator de crescimento derivado das plaquetas parece exercer este efeito quimiotático. O fator de crescimento de fibroblastos regula a replicação celular;

- ruptura da placa, originalmente nas regiões de maior densidade de macrófagos, porque estes liberam enzimas proteolíticas (metaloproteases) que colaboram para a ruptura. Segue-se a formação de um trombo mural ou oclusivo. Esta trombose contribui para o crescimento subsequente da placa;

- inflamação auto-imune, provavelmente em resultado da atividade antigênica da LDL oxidada.

A formação das células espumosas inicia-se pela entrada das lipoproteínas na região subendotelial, onde são interceptadas por radicais livres produzidos pelas células musculares lisas, macrófagos ativados e células endoteliais. Em decorrência da ação das espécies reativas, as lipoproteínas sofrem modificação oxidativa. Depois de terem sido modificadas, as lipoproteínas (oxi-

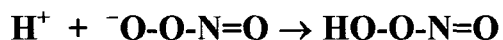
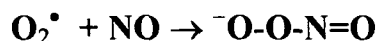
LDL) são fagocitadas pelos macrófagos através dos receptores chamados “scavenger”. Estes receptores não possuem mecanismo de retroalimentação negativa, de modo que as oxi-LDL são continuamente absorvidas para o interior dos fagócitos. Assim, formam-se as células espumosas, ricas em lipídeos e éster de colesterol. Concomitantemente, atraídos pela ação quimiotática da MCP-1 e das oxi-LDL, os monócitos circulantes continuam a atacar o endotélio.

Outro dado na formação das células espumosas diz respeito à dificuldade com que os macrófagos degradam a oxi-LDL. Em um experimento desenvolvido para investigar se a inativação das proteases lisossomiais é diretamente a responsável pela dificuldade na degradação, Hoppe e col. (1994) pré-incubaram macrófagos de peritônio de ratos com oxi-LDL e com LDL “in natura”. Observaram que as lipoproteínas marcadas com iodo radioativo acumulavam-se no interior dos macrófagos que tinham sido pré-incubadas com oxi-LDL, e que isto era devido, parcialmente, à inativação das proteases lisossomiais, notadamente a catapsina B. Importante também é a observação de que isto não ocorreu com os macrófagos pré-incubados com LDL “in natura”, concluindo-se que, provavelmente, a oxi-LDL foi a responsável pela destruição da catapsina B (HOPPE et al., 1994).

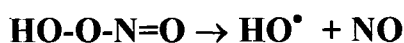
Outros efeitos atribuídos à oxi-LDL e que dizem respeito à fisiopatologia da reestenose são suas propriedades biorreguladoras. Estas lipoproteínas, minimamente oxidadas, preservam o reconhecimento pelo receptor de LDL (HEBERLAND & SMITH, 1996). As LDL minimamente modificadas pela oxidação

do ferro apresentam uma gama de efeitos moduladores, após a incubação com células musculares lisas e endoteliais. Estes efeitos biorreguladores incluem a expressão de um sítio de adesão específico de monócitos pelas células endoteliais, a indução da proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) pelas células endoteliais e musculares lisas, e os níveis aumentados de fatores de crescimento (HEBERLAND & SMITH, 1996). Em um estudo realizado por Maier e col. (1996), com cultura de células endoteliais humanas, observou-se que, em associação à oxi-LDL, houve a indução do crescimento celular, efeito este não verificado na presença de LDL nativa ou HDL. A oxi-LDL também induziu a expressão de citocinas e de fatores de crescimento (MAIER et al., 1996).

Uma das características mais importantes dos elementos reativos de oxigênio é sua capacidade de reagir inespecificamente com várias espécies químicas, gerando, muitas vezes, espécies mais reativas. Em particular, de grande importância biológica, é a capacidade de reação entre o ânion superóxido e o óxido nítrico. Como já referido anteriormente, o ânion superóxido é incapaz, por si só, de iniciar a peroxidação lipídica. Para isso, o ânion superóxido necessita ser convertido em um outro radical ativo, como o radical hidroxila. Esse processo se faz pela dismutação do superóxido para peróxido de hidrogênio e posterior redução a radical hidroxila pela reação de Fenton. Ademais, e de grande relevância na fisiologia vascular, é a capacidade de o superóxido reagir com o óxido nítrico (KAENEY & VITA, 1995; LAURINDO & LUZ, 1996). O radical superóxido reage rapidamente com o óxido nítrico formando o ânion peroxinitrito:



O ânion peroxinitrito comporta-se como um poderoso radical, podendo transferir átomos de oxigênio, oxidar proteínas, iniciar a peroxidação lipídica ou ser fonte de radical hidroxila pela reação abaixo:



Estes compostos, o radical hidroxila e o peroxinitrito, contribuem para diversas anormalidades das ações do Fator Relaxante Dependente do Endotélio, tais como a inibição da ação vasodilatadora, da antitrombótica e do crescimento celular (KAENEY & VITA, 1995; LAURINDO & LUZ, 1996).

A interação entre o endotélio e as plaquetas também é alterada pela ação do ânion superóxido. Por exemplo, a aderência das plaquetas ao endotélio, induzida pela trombina, é dramaticamente incrementada pela exposição ao ânion superóxido, sugerindo que a neutralização do óxido nítrico desempenha um papel importante na deposição plaquetária, favorecendo a agregação, ativação e expressão do Fator de Crescimento Derivados das Plaquetas (KAENEY & VITA, 1995).

Outras evidências do papel das espécies reativas de oxigênio na reestenose provêm de experimentos em animais hipercolesterolêmicos e de trabalhos clínicos realizados com antioxidantes. No entanto, poucos estudos foram realizados, até o presente momento, para avaliar especificamente o efeito de antioxidantes na reestenose. O probucol, um potente antioxidante sintético, reduziu significativamente a formação neo-intimal em modelo de reestenose experimental de suínos (GODFRIED & DECKELBAUM, 1995). Em um experimento realizado com primatas, encontrou-se uma redução de 43% nas áreas neo-intimais das aortas dos macacos tratados com probucol em relação ao grupo controle (SASAHARA et al., 1994). Os mecanismos básicos para os efeitos observados pelo probucol podem ser explicados por uma maior resistência do LDL à oxidação pelo cobre e por uma redução da peroxidação lipídica observada no grupo tratado com probucol (KEANEY et al., 1995). Outro experimento realizado por Freyschuss e col. (1993) no *Karolinska Institutet*, na Suécia, com BHT, um antioxidante sintético quimicamente similar ao probucol, demonstrou que a espessura neo-intimal dos coelhos tratados foi, em média, um quarto da observada no grupo controle ($p < 0.0001$). O número de células musculares lisas/mm² na íntima do grupo tratado foi a metade do observado no grupo controle ($p < 0.001$). A concentração dos subprodutos de auto-oxidação também foi menor no soro dos coelhos tratados com BHT. Estes resultados permitiram que se chegasse à conclusão de que o BHT inibiu de forma significativa o acúmulo de células musculares lisas e o desenvolvimento de neo-intima nas aortas dos coelhos hipercolesterolêmicos após

injúria por balão (FREYSCHUSS et al., 1993). O beta-caroteno e as vitaminas E e C são antioxidantes naturais utilizadas, também, em estudos experimentais de reestenose. A vitamina E reduziu significativamente a reestenose após angioplastia com balão em artérias femorais de coelhos hipercolesterolêmicos, em um estudo realizado por Lafont e col. (1995). Neste estudo, foi verificado que a LDL oxidada estimulava a síntese de DNA nas células musculares lisas, sendo que a vitamina E inibiu a síntese de DNA estimulada pela oxi-LDL. Estes achados foram consistentes com a hipótese de que as lipoproteínas oxidadas podem estimular a hiperplasia, e de que este antioxidante foi capaz de limitar a hiperplasia pela inibição da oxidação da LDL ou pela limitação dos seus efeitos proliferativos (LANFONT et al., 1995). Shaish e col. (1995) demonstraram uma melhora significativa na resposta vascular à injúria pós-angioplastia por balão em coelhos tratados com probucol e *trans*-carotenos. Este estudo dividiu os coelhos em grupos tratados respectivamente com probucol, vitamina E, *trans*- β -caroteno e 9 *trans*- β -caroteno. Neste estudo, o probucol protegeu a LDL da oxidação e inibiu a neo-íntima. A vitamina E protegeu a LDL modestamente e não interferiu sobre o desenvolvimento da neo-íntima. Ambos *trans*-carotenos reduziram a neo-íntima na mesma proporção do probucol, porém não protegeram a LDL da oxidação, sugerindo, então, que os carotenos podem prevenir a proliferação intimal por outro mecanismo que não pela proteção das lipoproteínas (SHAISH et al., 1995). Não obstante, em um estudo realizado com β -caroteno em modelo experimental de angioplastia com coelhos hipercolesterolêmicos, a área de hiperplasia intimal e o

percentual de estenose não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle (BURCHENAL et al., 1996).

Os mecanismos pelos quais os elementos antioxidantes interferem na formação da placa ateromatosa e no curso da reestenose pós-angioplastia não estão completamente elucidados. Todavia, alguns mecanismos prováveis podem ser arrolados. A redução do processo inflamatório em resposta à angioplastia pode teoricamente reduzir a intensidade da neoformação da íntima. Tem sido observado que a vitamina E reduz a inflamação, facilita a cicatrização das lesões, assim como reduz a formação de tecido fibroso (GUDFRIED & DECKELBAUN, 1995). Foi também observado que a vitamina C reduziu a aderência leucocitária, induzida pela oxi-LDL ao endotélio vascular (LEHER et al., 1995), e que a vitamina E inibiu a ação dos fatores de aderência leucocitária ao endotélio, tais como a IL-1 e a trombina (FARQUI et al., 1994). O probucol e a vitamina E, em baixas doses, preservam a função do Fator Relaxante Dependente do Endotélio, limitam o estresse oxidativo, reduzem a geração de superóxido (KEANEY et al., 1995) e impedem a oxidação da LDL pelas peroxidases (ESTERBAUER, 1993; KEANEY et al., 1995; OHARA et al., 1993).

Acrescentando as evidências experimentais apontadas, um outro conjunto de evidências do papel das espécies reativas de oxigênio na reestenose deriva de estudos clínicos observacionais e de intervenção. Dados indiretos podem ser extraídos de estudos populacionais em que se correlacionam a ingestão de antioxidantes com o desenvolvimento de doenças de origem aterosclerótica. Com o

objetivo de investigar o possível efeito benéfico da vitamina E sobre a incidência de doenças cardiovasculares, foram acompanhadas 87.245 enfermeiras livres de doenças cardiovasculares e de câncer durante sete anos. Foram as mesmas divididas em dois grupos de baixa e de alta ingestão de vitamina E. Transcorridos oito anos, o risco relativo de eventos cardíacos maiores (infartos não fatais e morte por doença coronária) foi de aproximadamente 30% menor no grupo da alta ingestão de vitamina E (STAMPFER et al., 1993). Do mesmo modo, um estudo com 39.910 profissionais de saúde norte-americanos do sexo masculino, acompanhados por quatro anos, demonstrou uma redução de aproximadamente 40% no risco relativo de eventos coronários maiores no grupo de ingestão alta de vitamina E (419 UI/dia) em relação ao grupo de baixa ingestão com 6 UI/dia em média (RIM et al., 1993). Resultados semelhantes foram encontrados em estudo realizado com 34.486 mulheres pós-menopausadas, com redução significativa no risco relativo de morte por doença coronária no grupo de ingestão mais elevada de vitamina E (KUSHI et al., 1996). Não foi encontrada, porém, redução significativa nos grupos de alta ingestão de vitaminas A e C (HENNEKENS et al., 1996; KUSHI et al., 1996; MORRIS et al., 1994). Outro estudo sobre o efeito da vitamina E em doenças cardiovasculares é o "Cambridge Heart Antioxidant Study". Nele foram avaliados por 510 dias seguidos, 2.002 pacientes com doença coronária definida pela cineangiocoronariografia. Destes pacientes, 1.035 receberam doses superiores a 400 UI/dia de vitamina E, e 967 receberam placebo. O tratamento

com vitamina E reduziu significativamente a mortalidade de infartos não fatais (LUZ & SERRANO, 1996; STEPHENS et al., 1995).

Até o presente momento, estudos que investigaram o efeito de antioxidantes na reestenose pós-angioplastia são pouco freqüentes. Apesar disso, em um estudo realizado por Demaio e col. (1992), que utilizou 1200 UI/dia de vitamina E em 100 pacientes, iniciadas no dia do procedimento, uma angiografia foi realizada, após quatro meses, em 86% dos pacientes que receberam vitamina E, e em 83% dos pacientes do grupo controle. A reestenose, definida como uma perda maior ou igual a 50% do ganho luminal pós-angioplastia imediata, foi de 35,5% no grupo tratado com vitamina E, contra 47,5% do grupo controle ($p=0,2$). A reestenose clínica definida com teste de esforço anormal teve, porém, uma diferença com significância marginal ($p=0,06$) de 34,4% nos pacientes tratados com vitamina E e 50% nos pacientes que receberam placebo (DEMAIO et al., 1992). Observamos, todavia, que este estudo teve seus resultados limitados principalmente por um número pequeno de pacientes acompanhados.

A prevenção da reestenose pós-angioplastia com antioxidantes foi avaliada em dois estudos recentes. Yokoi e col (1997) estudaram 91 pacientes submetidos à angioplastia, em que 46 tinham feito uso de probucol quatro semanas antes do procedimento e 45 não fizeram uso de qualquer droga antioxidante. Após 24 semanas da angioplastia, o grupo tratado com probucol apresentou um diâmetro luminal mínimo de $1,49 \pm 0,75$ mm (média \pm DP) e $1,13 \pm 0,63$ mm no grupo controle ($p=0,009$). A reestenose angiográfica, definida como uma estenose $\geq 50\%$

na angiografia de 6 meses, foi de 23% no grupo tratado e de 58% no grupo controle ($p=0.001$) (YOKOI et al., 1997). Um outro estudo clínico de grande importância, por se tratar de um estudo randômico e duplo-cego, que avalia a ação dos antioxidantes reestenose pós-angioplastia, foi realizado por Tardif e col. (1997). Neste estudo, foram avaliados 317 pacientes, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos tratados respectivamente com: placebo, probucol (500mg), multivitamínico (β -caroteno, vitamina C e E) e multivitamínico associado a 500mg de probucol. Estes medicamentos foram administrados, diariamente, durante quatro semanas antes e seis meses após a angioplastia. A média de redução do diâmetro luminal mínimo, seis meses depois da angioplastia, foi de $0,12\pm0,42$ mm no grupo tratado com probucol, $0,22\pm0,46$ mm no grupo tratado com multivitamínico e probucol, $0,33\pm0,51$ mm no multivitamínico e de $0,38\pm0,50$ mm no grupo placebo. Comparando-se os grupos tratados com probucol com o grupo placebo, obteve-se uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,006$), sendo que não foi observada diferença quando se comparou o grupo polivitamínico com o grupo tratado ($p=0,70$). A restenose angiográfica, definida como uma perda $\geq 50\%$ do diâmetro luminal mínimo na angiografia de seis meses, também apresentou resultados semelhantes. O índice de reestenose foi de 29,7% no grupo tratado com probucol, 28,9% no grupo de tratamento combinado, 40,3% no grupo multivitamínico e de 38,9% no grupo tratado com placebo. Comparando-se o grupo de probucol com os grupos que não fizeram uso deste medicamento, obteve-se uma diferença significativa ($p=0.003$), concluindo-se que o tratamento com o

antioxidante probucol é efetivo na redução do índice de reestenose nos pacientes submetidos à angioplastia coronária (TARDIF et al., 1997).

2.2.6 Outros Mecanismos Envolvidos na Reestenose

2.2.6.1 O Remodelamento Geométrico

Outro mecanismo envolvido na reestenose de um vaso submetido à angioplastia é o remodelamento geométrico. Como se sabe, a parede arterial é um “órgão” ativo e integrado por um complexo mecanismo parácreno e autócreno, constituindo-se por células endoteliais, musculares lisas e por um tecido conjuntivo. O remodelamento arterial é uma alteração estrutural que envolve quatro processos celulares fundamentais - *crescimento celular, morte celular, migração celular e produção ou degradação da matriz extracelular* - que dependem de interações dinâmicas entre fatores de crescimento locais, substâncias vaso-ativas e de estímulos hemodinâmicos (GLAGOV, 1994; GIBBONS et al., 1994). Fisiologicamente, o remodelamento arterial visa adaptar o diâmetro total de um vaso às condições hemodinâmicas por meio de alterações estruturais. O

remodelamento é um processo adaptativo que ocorre em resposta a alterações hemodinâmicas crônicas fisiológicas e no desenvolvimento da aterosclerose. Na aterosclerose, a artéria pode aumentar o tamanho total do vaso para compensar a diminuição da luz conseqüente ao espessamento intimal e restabelecer o fluxo original (CARAMORI et al., 1997). O remodelamento geométrico também faz parte da resposta vascular à angioplastia. Após a dilatação de uma obstrução arterial, ocorre uma constrição coronária aguda e crônica em maior ou menor grau. Este fenômeno tem sido denominado de remodelamento geométrico negativo, e sua participação na reestenose tem sido testada e valorizada recentemente (CARAMORI et al., 1997; GERTZ et al., 1994). Os mecanismos envolvidos neste processo, sem embargo, não estão completamente compreendidos. Laurindo e col. (1996) examinaram recentemente a hipótese de que processos de oxirredução poderiam influenciar o remodelamento arterial pós-angioplastia. Com esta finalidade, desenvolveu um experimento com artérias ilíacas de coelhos (LAURINDO & LUZ, 1996). O calibre vascular foi seqüencialmente quantificado aos 7 e 28 dias após lesão em artérias ilíacas intactas em coelhos controle (n=11) e tratadas por 28 dias com antioxidantes N-acetilcisteína (n=9) e alopurinol (n=9). Como neste modelo a neo-íntima, após sete dias, é desprezível, mudanças fixas no calibre arterial refletem o grau de remodelamento. Nos controles, a insuflação pelo balão distendeu o calibre vascular em $42 \pm 4\%$ vezes o normal. No sétimo dia, o calibre vascular estava reduzido a $16 \pm 4\%$ vezes acima do normal e não foi alterado pela ação da acetilcolina e mononitrato de isossorbitol, demonstrando que

essa perda não foi devido a alterações vasomotoras. Em contraste, essa perda do calibre arterial foi totalmente prevenida nos grupos tratados com os antioxidantes N-acetilcisteína e alopurinol. As análises dos calibres arteriais efetuadas 28 dias depois, não demonstraram, contudo, essa alteração pelos antioxidantes. Podemos concluir, pois, que o vaso apresenta um remodelamento negativo pós-angioplastia, que este remodelamento depende, em parte, de processos redox e que pode ser prevenido, na fase precoce, pela ação de antioxidantes.

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 MATERIAL DE EXPERIMENTAÇÃO - ANIMAIS E BIOTÉRIO

No estudo foram utilizados dezesseis coelhos adultos do sexo masculino da raça New Zealand com peso variando entre 1550 e 3450 gramas.

Ao chegar ao biotério, os animais foram pesados e examinados por uma pessoa experiente, com o objetivo de evitar a inclusão de coelhos portadores de alguma doença contagiosa ou que pudessem comprometer o desenvolvimento do experimento.

O biotério é equipado de um sistema de exaustão e ventilação com temperatura controlada, permitindo a manutenção de uma temperatura ambiente em torno de 21° C. Os animais foram colocados em gaiolas de arame resistente, posicionadas sobre recipientes apropriados para o recolhimento de dejetos, evitando-se deste modo o acúmulo no seu interior. As gaiolas são equipadas com vidros com bicos que permitem a sucção de água pelos animais, e com um recipiente onde é acondicionada a dieta.

Os animais permaneceram em observação por sete dias para sua adaptação.

3.2 DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO

Após o período de adaptação, todos os coelhos foram submetidos a dieta hipercolesterolêmica à 1% durante 36 dias, período em que durou o experimento . Os animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos denominados A e B, e numerados de 1 a 8 (grupo A) e 9 a 16 (grupo B). Os animais do grupo A foram alimentados com dieta hipercolesterolêmica à 1% e vitamina E , 30mg /Kg/dia, por via oral (Ephinal-Roche) e aos animais do grupo B foi-lhes ofertada somente a dieta hipercolesterolêmica à 1%.

Todos os coelhos (grupos A e B) permaneceram em suas dietas por 36 dias, sendo que no 15º dia foram submetidos ao procedimento de criação das lesões.

No 36º dia, antes do sacrifício dos animais, foram colhidas amostras de sangue para a dosagem do Colesterol Total, LDL, HDL e Triglicerídeos.

3.3 DOSAGENS SANGUÍNEAS

Foram colhidas amostras de sangue dos animais para as dosagens de colesterol, LDL, HDL e triglicerídeos pelos seguintes métodos:

a) Colesterol - método enzimático colorimétrico automatizado pela hidrólise dos ésteres de colesterol em colesterol.

b) Triglicerídeos - método enzimático colorimétrico automatizado pela hidrólise dos triglicerídeos.

3.4 PREPARO DA RAÇÃO

A dieta rica em colesterol, na concentração de 1%, foi preparada da seguinte maneira:

O colesterol 95% (Aldrich Chemical Company, Inc. USA.) foi pesado em balança de precisão (Helmach HM 3300) e diluído em clorofórmio 95%, na proporção de 4 ml de clorofórmio para cada 1 grama de colesterol, em um misturador magnético, até sua completa dissolução. Esta solução, depois de dissolvida, foi, então, vaporizada sobre a ração, previamente pesada e peneirada, com um pulverizador de pressão controlada, de modo a proporcionar uma mistura homogênea.

Antes de ser oferecida aos animais, esta ração era mantida em uma estufa por, no mínimo, 24h, para a evaporação do clorofórmio e a completa eliminação do odor.

Eram preparadas, a cada vez, 15 Kg de ração, quantidade esta que os coelhos consumiam em aproximadamente uma semana.

3.5 INDUÇÃO DAS LESÕES ARTERIAIS

Após colocação cuidadosa dos animais em uma caixa especialmente preparada para a fixação dos coelhos (Figura 1 e 2), foi realizada a tricotomia e anti-sepsia da região dorsal do ambos as orelhas (Figura 3 e 4). Em seguida, procedeu-se ao bloqueio bilateral do nervo auricular com injeção subcutânea de lidocaína 2% na base das orelhas.

Com uma pinça Kelly reta número 16, apresentando um disco de feltro (medindo 5 mm de diâmetro com 2 mm de espessura) fixado em sua ponta, (Figura 5 e 6) foi realizada a compressão em dois segmentos de cada artéria (proximal e distal) (Figura 6, 7 e 8). A compressão foi mantida por 30 minutos (Figura 9 e 10), sendo estes segmentos marcados, depois, com tinta indelével.

Após criada as lesões, os animais voltaram para suas respectivas dietas por mais 21 dias.

3.6 ADMINISTRAÇÃO DA VITAMINA E E DA DIETA.

Foi utilizada a vitamina E (Ephynal-Roche), cuja apresentação é de 400mg de acetato de alfa-tocoferol em cápsulas oleosas de 0,5 ml.

O conteúdo destas cápsulas era extraído com uma seringa de insulina e, depois do ajuste da dose, era administrado cada dia aos coelhos, diretamente na cavidade oral.

A dieta hipercolesterolêmica era oferecida à vontade, mantendo-se os recipientes sempre cheios.

3.7 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

O sacrifício dos animais foi realizado no 36º dia. Pesados e anestesiados com clorofórmio, os coelhos foram colocados nas caixas de fixação, sendo-lhes retirado sangue para a dosagem bioquímica. Após uma dose letal de clorofórmio, as orelhas foram removidas e os locais onde se fizeram as lesões foram identificados com pontos de linha preta, para as lesões proximais, e com linhas azuis para as distais. Estas peças foram fixadas em solução de formol (10%), tamponada com fosfato ($\text{ph}=7,6$), por um período superior a 24 horas.

3.8 AVALIAÇÃO DAS LESÕES

Após a fixação, as 64 lesões foram identificadas pela seguinte forma: cada orelha foi numerada de conformidade com a do animal de origem em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16. Se provenientes da orelha direita, adicionou-se a letra D após o número; se da esquerda, a letra E; e, finalmente,

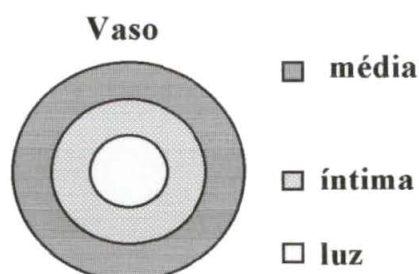
como foram efetuadas duas lesões em cada orelha (proximal e distal), acrescentaram-se as letras P para proximal e D para distal.

Os locais das lesões, de aproximadamente 6 mm de extensão, foram seccionados em três segmentos com dois milímetros de intervalo e processados pelos métodos usuais de histologia, emblocados em parafina, cortados na espessura de 5 micrômetros e corados pela hematoxilina-eosina (H.E.), pelo método tricrômico de Masson (Fig. 11e 12) e de Van Gieson (fig. 13 e 14).

3.9 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A planimetria digital dos cortes histológicos foi realizada por um técnico do Montreal Heart Institute (Quebec, Canadá) que desconhecia o significado da identificação das lâminas. Para isso, foi utilizado um microscópio óptico (modelo Diaplan, Leitz Co) conectado a uma mesa digitalizadora e a um computador IBM-compatível, empregando o programa Sigma Scan. A área da luz, circunscrita pela lâmina limitante elástica interna (lúmen original) e a área total do vaso, circunscrita pela borda externa da camada média, foram mensuradas diretamente. As áreas totais da camada média e da neo-intima foram deduzidas por subtração: área da média (Δ **média**) = área total do vaso (Δ **vaso**) – área circunscrita pela lâmina limitante elástica interna (Δ **luz original**); área neo-intimal = área circunscrita pela lâmina limitante elástica interna (Δ **luz original**) – área da luz (Δ **da luz**). Utilizou-se, como representativo do desenvolvimento da lesão, a área neo-intimal que foi

relacionada pela dimensão de cada vaso, medindo-se o valor percentual da neo-íntima em relação à área da camada média.



$$\Delta \text{ média} = \Delta \text{ total do vaso} - \Delta \text{ luz original}$$

$$\Delta \text{ neo-íntima} = \Delta \text{ luz original} - \Delta \text{ luz}$$

Como de cada lesão foram feitos três cortes, a avaliação da lesão foi feita mediante a média dos valores percentuais da neo-íntima obtidos de cada corte. Este valor médio, assim obtido, foi utilizado como unidade representativa da extensão da neo-íntima de cada lesão para o cálculo estatístico.

$$\Delta \text{ da neo-íntima da lesão} = \Delta \text{ neo-íntima (1º corte)} + \Delta \text{ neo-íntima (2º corte)} + \Delta \text{ neo-íntima (3º corte)} \div 3$$

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram representadas em tabelas por média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos.

Recorreu-se à análise descritiva dos dados (médias das íntimas, valores de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e peso) e na forma de gráficos.

A comparação entre o grupo tratado (A) e o grupo controle (B) foi feita através dos testes paramétricos 't de Student' e do não-paramétrico "Mann-Whitney" pelo software "*Primer of Biostatistics*".

Adotou-se o nível de significância de 0,05 ($\alpha=5\%$). Níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 PESO DOS ANIMAIS.

Os animais foram pesados na chegada ao biotério e no dia dos sacrifício.

Na primeira avaliação, no dia da chegada ao biotério, os coelhos do grupo A e do grupo B não apresentaram diferença significativa. No dia do sacrifício, também não houve diferença significativa entre os grupos. Portanto, em relação ao peso, tanto inicial como final, os grupos não diferem entre si (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Peso dos animais (g) no início do experimento.

Grupo	Média ± D.P.	Mínimo	Máximo
A	2256,25±774,8	1550	3450
B	2387,50±936,46	1650	3900

p>0,06

Gráfico 1 - Peso Médio do Grupo A e do Grupo B

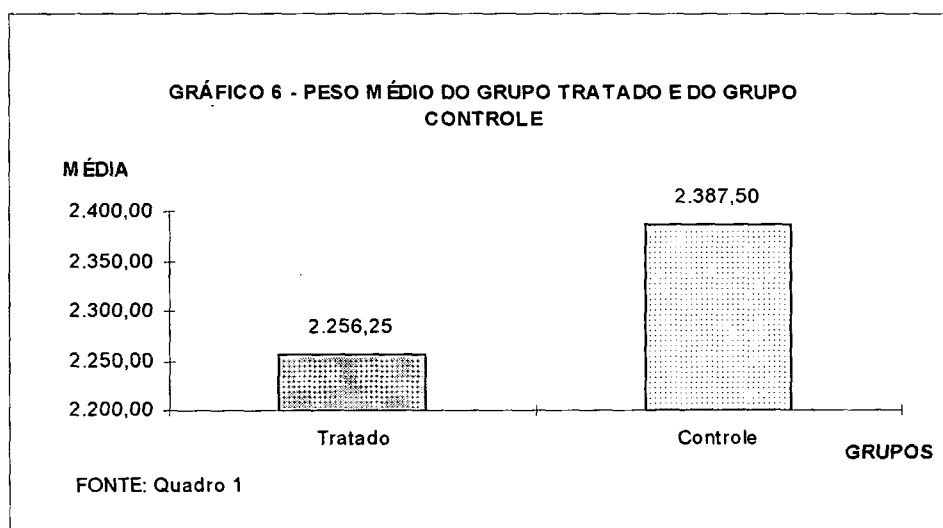


Tabela 2 - Peso dos animais (g) no final do experimento

Grupo	Média \pm D.P.	Mínimo	Máximo
A	2800 \pm 489,9	2300	3800
B	3064 \pm 621,6	2300	3950
p=0,394			

4.2 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

4.2.1 Níveis de Colesterol Total

O sangue para a dosagem do colesterol foi retirado no final do experimento, imediatamente antes do sacrifício dos animais.

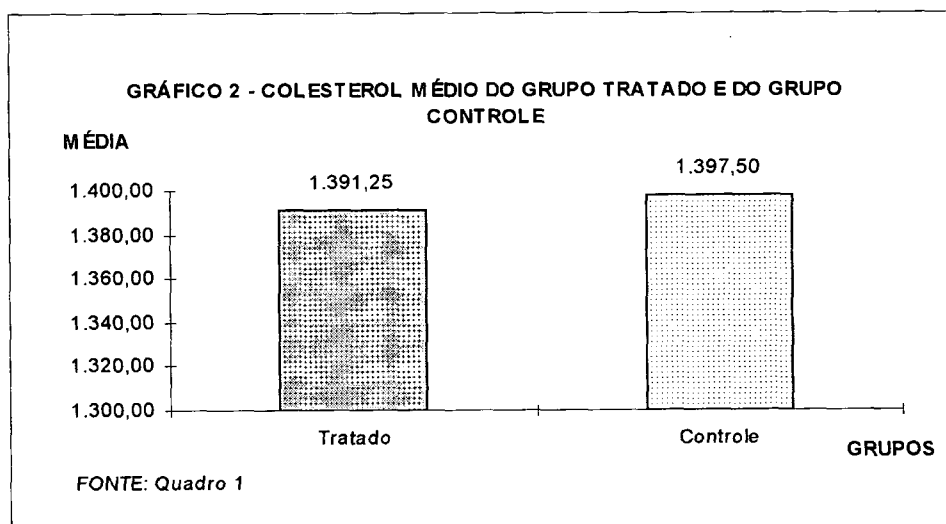
Não foi verificada diferença significativa nos níveis de colesterol total dos dois grupos. Revelando que, em relação ao nível sérico de colesterol, os dois grupos não diferem significativamente entre si (Tabela 3).

Tabela 3 - Colesterol sérico (mg/dl) dos animais

Grupo	Média \pm D.P	Mínimo	Máximo
A	1391,25 \pm 703,8	670,0	2530,0
B	1397,50 \pm 516,9	950,0	2330,0

p.>0,06

Gráfico 2 - Colesterol Médio do Grupo A e do Grupo B



4.2.2 Níveis de triglicerídeos

As dosagens séricas de triglicerídeos foram efetuadas simultaneamente às de colesterol total.

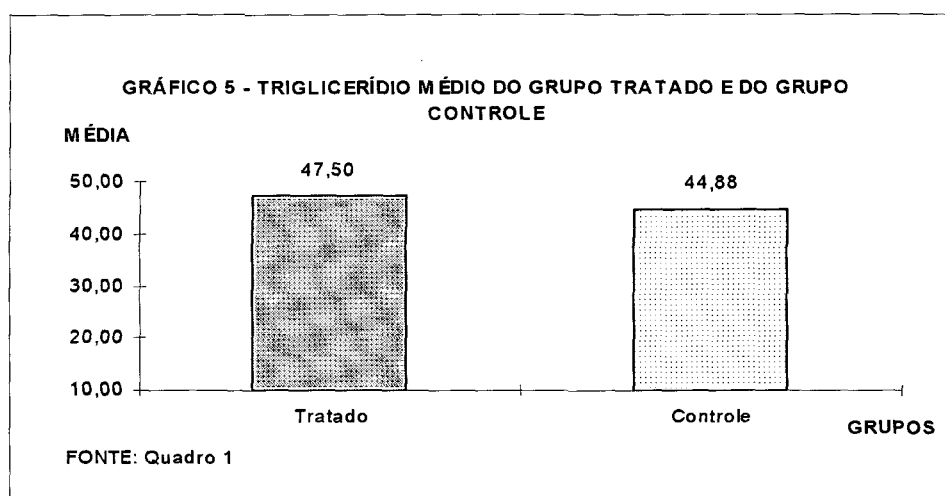
O nível sérico de triglicerídeos não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos A e B (Tabela 4).

Tabela 4 - Triglicerídeos (mg/dl) séricos dos animais

Grupo	Média \pm D.P.	Mínimo	Máximo
A	47,50 \pm 31,3	10,0	103,0
B	44,8 \pm 46,27	10,0	142,0

$p > 0,06$

Gráfico 3 - Triglicerídeo Médio do Grupo A e do Grupo B



4.2.3 Níveis de HDL e LDL

As dosagens séricas de HDL e LDL foram realizadas simultaneamente às de colesterol e triglicerídeos. Não se observou, também, diferença significativa dos níveis séricos das lipoproteínas nos dois grupos (Tabela 5 e 6).

Tabela 5 - Níveis de HDL (mg/dl)

Grupo	Média ± D.P.	Mínimo	Máximo
A	10,12 ± 0,35	10,0	11,0
B	11,25 ± 3,15	10,0	19,0

$p > 0,06$

Gráfico 4 - Média de HDL do Grupo A e do Grupo B

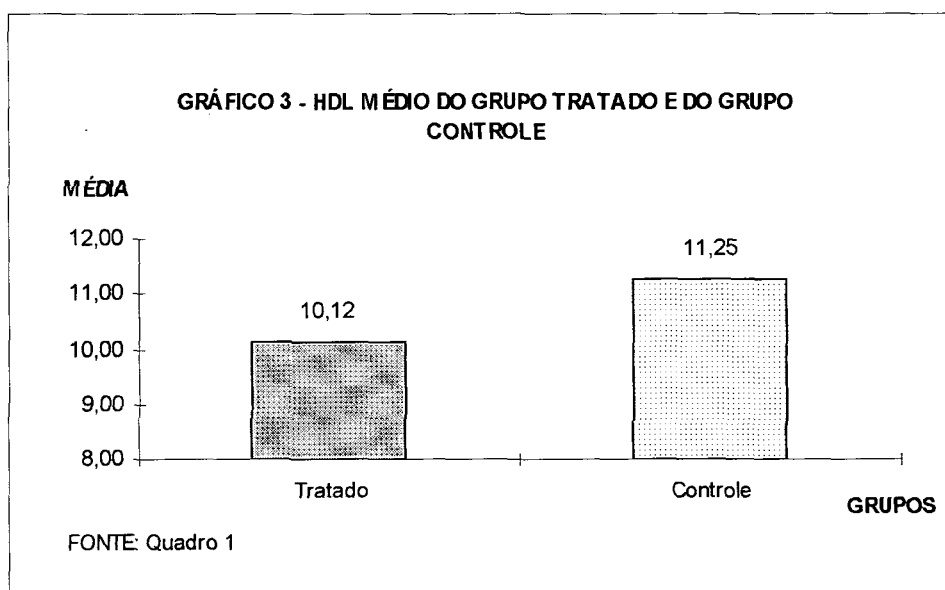
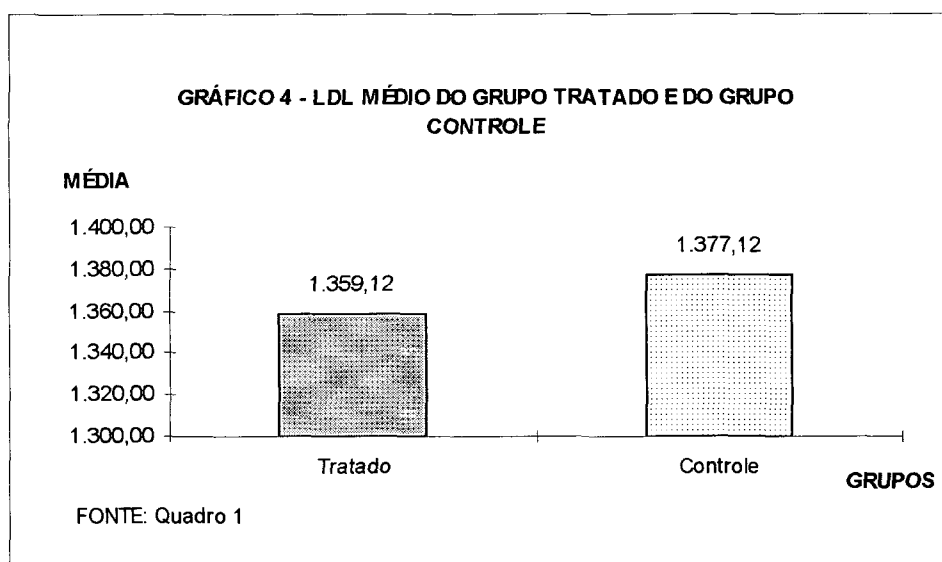


Tabela 6 - Níveis de LDL (mg/dl)

Grupo	Média ± D.P.	Mínimo	Máximo
A	1359,12 ± 684,9	638,0	2428,0
B	1377,12 ± 510,07	925,0	2216,50

p>0.06

Gráfico 5 - LDL Médio do grupo A e do Grupo B



4.3 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DAS LESÕES ARTERIAIS

As lesões provocadas sobre a artéria central das orelhas dos coelhos foram analisadas em cortes histológicos dos segmentos arteriais cortados

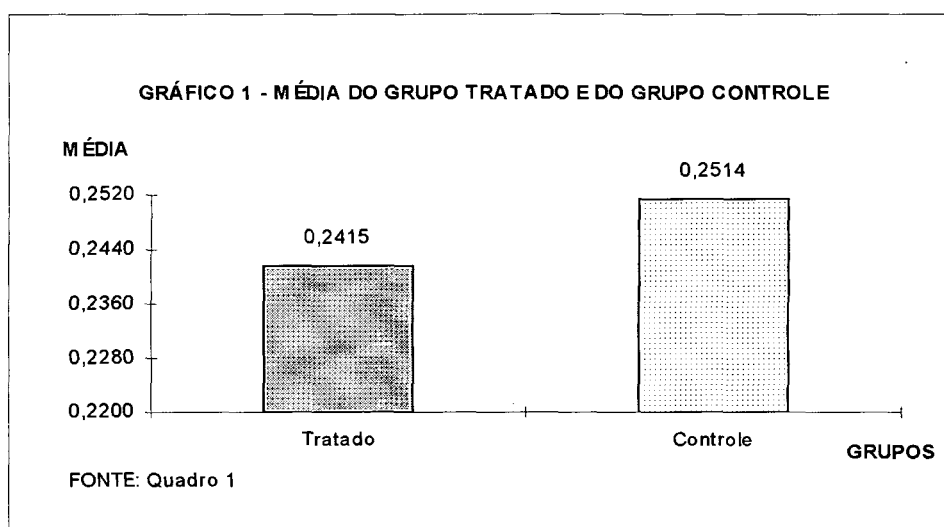
transversalmente (Fig. 15,16,17, e 18). Os valores das áreas das camadas média e neo-íntima obtidas de cada lesão (três medidas de cada lesão) foram somadas, extraída a média aritmética simples. O valor médio da camada íntima foi expressa em percentual da área da camada média. Comparando-se os valores, assim obtidos, das lesões de cada grupo, não obtivemos diferença estatisticamente significativa (Tabela 7).

Tabela 7 - Valor percentual (%) das áreas (mm^2) de neo-íntima em relação à área da média (mm^2)

Grupo	Média \pm D.P.	Mínimo	Máximo
A	24,15 \pm 12,89	11,090	75,70
B	25,14 \pm 14,67	11,634	96,86

p=0,587

Gráfico 6 - Média dos valores da neo-íntima do Grupo A e do Grupo B



5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A reestenose é uma cicatrização arterial em resposta à injúria causada pela angioplastia. Quatro fatores atuam em conjunto neste processo: a retração elástica aguda e crônica do vaso; a trombose parietal sobre o local lesado; a proliferação e migração das células musculares lisas e a formação excessiva da matriz extracelular. A contribuição relativa de cada um destes fatores ainda não está estabelecida. Porém, por muito tempo, predominou a hipótese proliferativa (SCHWARTZ, R.S., 1994). Provavelmente por esta razão, a grande maioria dos modelos experimentais para o estudo da reestenose em animais avaliam quase que exclusivamente a proliferação e a migração celular. Dentre os modelos experimentais, destacam-se o modelo com artérias carótidas de ratos, o modelo com artérias ilíacas de coelhos hipercolesterolêmicos e os modelos com carótidas e artérias de suínos (SCHWARTZ, R.S., 1994). Outros modelos menos utilizados são os realizados com macacos (SASAHARA et al., 1994), cães (SCHWARTZ, R.S., 1994) e o de injúria sobre a artéria auricular do coelho (BANAI et al., 1991). Na investigação do papel dos radicais livres na reestenose, segundo nossa revisão, o método da artéria ilíaca de coelhos hipercolesterolêmicos é o mais empregado. Esta técnica consiste no emprego de uma dieta com 1% a 2% de colesterol com 7% de óleo de amendoim, aliada a uma injúria mecânica nas duas artérias ilíacas com um cateter-balão 3 Frentz. Seis semanas após o início da

injúria arterial, realiza-se a angiografia de controle. Se houver lesões obstrutivas significativas, procede-se à angioplastia. Nesta técnica, o resultado pode ser analisado com mais quatro semanas da angiografia de controle. O colesterol plasmático varia entre 1000mg/dl a 2000mg/dl (SCHWARTZ, R.S., 1994).

Como o nosso estudo teve por objetivo avaliar se a administração vitamina E reduziria a proliferação neo-intimal pela análise quantitativa das áreas afetadas, optamos pelo método de injúria sobre a artéria auricular do coelho. Este método foi avaliado recentemente pelo Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Experimental da divisão de Cardiologia do “National Heart, Lung, and Blood Institute” dos Estados Unidos e descrito em artigo recente (BANAI et al., 1991). Este modelo experimental destina-se a avaliar a fisiopatologia das síndromes vasculares determinadas, em grande parte, pela proliferação de células musculares lisas e para testar modalidades terapêuticas que inibam este processo. Elegemos este modelo para nosso experimento por não necessitar de procedimentos invasivos, uma vez que a lesão sobre a artéria central da orelha do coelho, que é bastante superficial, é criada por uma compressão externa da artéria. Vários sítios de injúria podem ser criados numa mesma artéria, produzindo-se, de modo fácil e rápido, um grande número de lesões. A hipercolesterolemia foi conseguida pela adição de colesterol à ração dos animais na concentração de 1%. Isso posto, alguns aspectos devem ser analisados:

- A Hipercolesterolemia

Os valores de colesterol total obtidos nos dois grupos foram, em média, $1391,25 \pm 703,81$ mg/dl para o grupo A e de $1397,50 \pm 516,99$ mg/dl para o grupo B, sem diferença estatística ($p > 0.05$). Observamos que estes valores, apesar de altos, estão em concordância com valores apresentados e propostos, na publicação do N.H.L.B.I. (BANAI et al., 1991).

- A intensidade e o tempo de compressão

No estudo piloto, comparamos quatro modelos em que variamos o *tempo* e a *intensidade* de compressão. O primeiro, foi executado por um período de 15 minutos, utilizando-se um pinçamento vigoroso no primeiro dente da pinça Kelly número 16; o segundo modelo foi realizado num período 30 minutos com a mesma intensidade de compressão. No terceiro e quarto modelos, desenvolvemos um sistema de fixação na pinça Kelly, para possibilitar uma compressão mais suave. Estes também duraram 15 e 30 minutos, respectivamente. Na avaliação histológica, após 15 dias de provocada a lesão, não foi observada diferença no desenvolvimento neo-intimal e na intensidade do rompimento da Lâmina Elástica Interna. Deste modo, optamos por executar uma compressão externa mais suave, uma vez que foi observado um trauma menor sobre o couro da orelhas dos animais. Em *todos* os coelhos aplicamos a mesma *intensidade* e o mesmo *tempo* de compressão.

- Uso da vitamina E

Em todos os estudos em animais, a administração dos antioxidantes precedeu à angioplastia, acompanhando, inclusive, o início da dieta

hipercolesterolêmica. A pré-medicação com antioxidantes antes da angioplastia parece ser fundamental para poder modificar o transcurso da reestenose. A pré-medicação permite aos antioxidantes lipossolúveis, tais como a vitamina E, o BHT e o β -caroteno, se incorporarem às lipoproteínas e às membranas, chegando na intimidade das moléculas que estariam sofrendo modificações oxidativas. No nosso estudo também administramos a vitamina E, junto ao início da dieta hipercolesterolêmica, antes de produzirmos as lesões arteriais. A dose adotada por nós foi de 30mg/kg/dia, o que corresponde a uma dose 3 vezes maior do que a dose máxima recomendada para humanos, podendo, por isso, ser considerada uma dose alta. Dispúnhamos de três tipos diferentes de vitamina E : O Acetato de DL-alfa-tocoferol (Merck, art. 500949) , o Acetato de DL- α -tocoferol hidrossolúvel (Merck, art. 500862) e o Acetato DL- α -tocoferol (Roche, Ephynal 400mg em cápsulas gelatinosas). Inicialmente pensamos em utilizar o Acetato DL- α -tocoferol hidrossolúvel (Merck, art. 500861) diluída na água dos coelhos. Porém, frente à possibilidade teórica da não incorporação desta vitamina nas lipoproteínas e nos compartimentos lipídicos, podendo, com isso, chegar a um falso resultado negativo, abandonamos tal idéia. As vitaminas lipossolúveis poderiam ser administradas diluídas na ração animal ou diretamente em solução junto ao óleo de amendoim. Diluída na ração animal, a vitamina E ficaria em contato com o ar por um tempo prolongado. Temendo, por isso, a sua deterioração, resolvemos utilizá-la acondicionada em cápsulas. Desta forma, o conteúdo das cápsulas foi retirado diariamente, no momento da administração, por meio de seringas de

insulina, e, após ajuste da dose, aplicado diretamente na cavidade oral dos animais.

5.1 RESULTADOS DA ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS LESÕES

Após provocadas as lesões arteriais, os coelhos retornaram às dietas anteriores com 1% de colesterol e 30mg/kg/dia de vitamina E para os coelhos do grupo A e 1% de colesterol para os coelhos do grupo B. No final do estudo, os dois grupos não apresentaram diferença significativa quanto ao peso e dosagens séricas de colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos. Os valores percentuais obtidos das áreas de neo-íntima em relação às áreas da média obtidos nos dois grupos foram, em média, $24,15\% \pm 12,89\%$ para o grupo A e de $25,14\% \pm 14,67\%$ para o grupo B, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,587$).

Para explicar tais resultados, revisaremos inicialmente os dados obtidos da literatura. Várias informações podem ser obtidas em recente revisão feita por Daugharty e Roseclaar (DAUGHARTY & ROSECLAAR, 1995). Neste artigo encontram-se os resultados obtidos de 15 experimentos desenvolvidos por autores diferentes. Com exceção de dois trabalhos feitos com suínos e macacos, quase todos foram executados utilizando-se coelhos hipercolesterolêmicos com injúria por balão. Os antioxidantes utilizados foram o probucol, BHT e as vitaminas E e C.

Cinco experimentos fizeram uso de probucol, um de BHT, um das vitaminas E e C associadas, seis com vitamina E e dois com vitamina C. Dos experimentos com probucol, *quatro* diminuíram significativamente o espessamento neo-intimal e *um* não apresentou diferença. O experimento com BHT diminuiu a espessura neo-intimal em 75%. Dos experimentos realizados com vitamina E, quatro não modificaram o desenvolvimento neo-intimal e dois apresentaram resultados positivos. E, finalmente, em somente um experimento realizado com vitamina C houve redução estatisticamente significativa da espessura neo-intimal. Analisando estes experimentos, observamos que o probucol apresentou os resultados mais constantes e que houve uma maior discrepância nos resultados dos grupos em que foram utilizadas as vitaminas E e C. Isto pode ser devido, em parte, às diferentes doses administradas, que variaram entre 1% e 0,025% da dieta. Sem embargo, verificamos resultados positivos em outros dois experimentos realizados com dose baixa e alta dose de vitamina E (5mg/kg/dia e 40mg/kg/dia de vitamina E) (LANFONT et al., 1995; PRASAD et al., 1993). Interessante é observar que em ambos os experimentos os subprodutos da peroxidação lipídica encontram-se diminuídas em relação aos grupos controles. O efeito do β -caroteno no desenvolvimento neo-intimal pode ser verificado em dois experimentos desenvolvidos com coelhos (BURCHENAL et al., 1996; SHAISH et al., 1995). Nestes, o β -caroteno não foi capaz de alterar a proliferação neo-intimal nem alterar a oxidação da LDL, embora os *trans* β -carotenos tenham diminuído a

aterosclerose nos coelhos hipercolesterolêmicos na mesma intensidade do probucol (SHAISH et al., 1995).

Pelo que foi exposto acima, podemos observar que os resultados obtidos variam bastante. Entretanto, apesar de haver alguns trabalhos com a vitamina E mostrando a inexistência de efeito sobre a reestenose, outros experimentos têm verificado uma redução significativa da hiperplasia intimal pós-angioplastia.

No nosso experimento, em particular, a vitamina E falhou em demonstrar efeito sobre o desenvolvimento neo-intimal pós-angioplastia. Vários fatores podem ter contribuído para explicar estes resultados.

Pelas razões expostas acima, na parte referente à intensidade ao tempo de compressão, optamos por utilizar, na criação das lesões arteriais, uma compressão mais suave. Para isto, desenvolvemos um mecanismo de fixação das pinças Kelly. Com este método, a média dos valores obtidos das áreas de neo-intima foi de $25,14\% \pm 14,67\%$ em relação à área da camada média no grupo B (não tratado com vitamina E) e de $24,15\% \pm 12,89\%$ no grupo A ($p=0,587$). Considerando que a intensidade de compressão utilizada no experimento desenvolvido pelo Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Experimental da divisão de Cardiologia do “National Heart, Lung and Blood Institute” (BANAI et al., 1991) foi maior, existe a possibilidade de que a intensidade de compressão utilizada por nós tenha sido insuficiente para criar uma injúria endotelial necessária para desenvolver a lesão. Nesse sentido, a falta de diferença estatisticamente significativa dos valores de neo-intima encontrados nos dois grupos do nosso

estudo ($p=0,587$), pode não ter sido em consequência da falha da vitamina E em prevenir a proliferação intimal, e, sim, de não termos conseguido um crescimento intimal suficiente, no grupo controle, para demonstrar o seu efeito benéfico.

Não obstante, outro fator pode ser o tipo de vitamina E utilizado no experimento. Segundo informações obtidas junto aos fabricantes Merck e Roche, existem vários produtos sintéticos de vitamina E. São eles: o DL- α -tocoferol ($C_{29}H_{50}O_2$, Peso mol: 430,72) que é lipossolúvel e apresenta baixa estabilidade em contato com o oxigênio, sendo destruído rapidamente por agentes oxidantes; o acetato de DL- α -tocoferol ($C_{31}H_{52}O_3$, Peso mol: 472,76) que é lipossolúvel, apresenta bastante estabilidade em contato com o ar e não é destruído com facilidade por agentes oxidantes; o succionato de DL- α -tocoferol ($C_{33}H_{54}O_5$, Peso Mol: 530,80) que, também é lipossolúvel, apresenta muita estabilidade ao oxigênio, e praticamente não é destruído por agentes oxidantes; e o acetato de DL- α -tocoferil que difere basicamente do DL α -tocoferol por ser insensível ao oxigênio e não apresentar nenhum efeito antioxidante. Estes podem ser encontrados em formulações oleosas, aquosas, ou em forma de pó. Segundo os fabricantes, o DL- α -tocoferol tem aplicação como antioxidante em farmácia, cosmética e na indústria alimentar por retardar a destruição oxidativa de geléias, de vitamina A, do caroteno e na conservação de óleos e azeites. O acetato de DL- α -tocoferol teria somente aplicação ao enriquecimento de alimentos e, na farmácia, como tratamento das carências alimentares. O succionato de DL- α -tocoferol para preparações farmacêuticas secas.

No nosso experimento, utilizamos o acetato de DL- α -tocoferol (Roche, Ephynal 400mg) na dose de 30mg/kg/dia, administradas diretamente na cavidade oral. Como referido anteriormente, este produto apresenta uma boa estabilidade com o oxigênio e sua ação antioxidante é limitada em comparação com o DL- α -tocoferol. Em consequência, este medicamento pode não ter exercido plenamente sua ação antioxidante e não ter inibido a proliferação e o desenvolvimento neo-intimal. Como, no nosso trabalho, não avaliamos a resistência das lipoproteínas à oxidação nem dosamos os subprodutos da peroxidação lipídica, esta hipótese fica sem conclusão definitiva.

A dose de Vitamina E utilizada também pode ser relevante para explicar o resultado do nosso experimento. Um aspecto importante das pesquisas sobre a hipótese dos radicais livres nas doenças cardiovasculares envolve o estudo dos mecanismo da oxidação das lipoproteínas. A LDL é uma partícula esférica com peso molecular de aproximadamente 2,5 milhões. O núcleo, que é composto por ésteres de colesterol e de triglicerídeos, é circundado por uma camada única de fosfolipídeos e de colesterol livre. Incrustada na monocamada, existe uma grande proteína denominada apolipoproteína B (apo B). A oxidação da LDL modifica certas moléculas de apo B, sendo os grupos ϵ -amino de resíduos de lisina particularmente suscetíveis (ESTERBAUER et al., 1993). A partícula de LDL contém moléculas de colesterol (livres e esterificadas) e um número de ácidos graxos ligados a diferentes classes lipídicas, sendo aproximadamente a metade compostas de ácidos graxos poliinsaturados que são altamente suscetíveis à

peroxidação lipídica. Por isso, a LDL é protegida pela presença natural de vários antioxidantes. Os antioxidantes possivelmente encontrados na LDL são o α -tocoferol, o γ -tocoferol, o β -caroteno, o α -caroteno, licopene, criptoxantina, cantaxantina, luteína, zeaxantina, fitofluene, retinóides e ubiquinol-10. De todos, o antioxidante principal é o α -tocoferol, presente em quantidades de 20 a 300 vezes maiores do que todos os antioxidantes reunidos (ESTERBAUER et al., 1993). O mecanismo antioxidante do α -tocoferol é de interceptar os radicais de peroxila lipídica (LOO^{\bullet}) e terminar a reação em cadeia de peroxidação lipídica. Neste processo, o tocoferol é convertido em radical tocoferoxil que, apesar de ser um radical livre, em circunstâncias normais é relativamente estável e insuficientemente reativo para iniciar uma nova peroxidação lipídica. Visto que o α -tocoferol é convertido no radical tocoferoxil, se este metabolito não for novamente regenerado a tocoferol pela ação de um outro antioxidante, as altas concentrações do radical tocoferoxil poderiam exercer um efeito contrário como um elemento oxidante. Observa-se que na oxidação da LDL "in vitro", quando se utiliza o peróxido de hidrogênio na ausência de metais de transição, a adição de vitamina E aumenta o índice de oxidação (SANTANAM et al., 1995). Esta peculiaridade da ação do α -tocoferol é chamada de efeito pró-oxidante da vitamina E. Este efeito pode ser examinado em um experimento feito com coelhos em que se utilizou alta e baixa dose de DL α -tocoferol (KEANEY et al., 1994). Nesta experiência, foram comparados quatro grupos de coelhos: um grupo controle, alimentado com ração sem adição; um grupo com dieta enriquecida com 1% de colesterol; um grupo com

dieta de 1% de colesterol e 1000 UI/kg/dia de vitamina E (dose baixa) e um grupo com dieta de 1% de colesterol mais 10.000 UI/kg/dia de vitamina E (dose alta). Após 28 dias, o teste de relaxamento dependente do endotélio com acetilcolina estava alterado no grupo hipercolesterolêmico em relação ao grupo controle ($p=0,001$), mas preservado no grupo de baixa dose de vitamina E ($p=NS$). Comparando-se o grupo de alta dose de vitamina E com os grupos controle e de baixa dose de vitamina E, o relaxamento arterial encontra-se profundamente alterado ($p=0,05$) nos vasos do grupo da alta dose, com um crescimento intimal significativamente maior do que o dos outros grupos ($p=0,05$). Estes resultados demonstraram que a baixa dose de vitamina E foi capaz de preservar a vasodilatação dependente do endotélio a despeito da hipercolesterolemia, e que a dose elevada alterou o relaxamento arterial e favoreceu o crescimento intimal. Isso pode ser explicado pela capacidade que tem a vitamina E de intensificar a oxidação da LDL e de inativar o FRDE (KEANEY et al., 1994). Tem sido demonstrado que a oxidação da LDL pode ser favorecida, em altas concentrações de vitamina E, pela ação do radical tocoferoxil aquoso presente na própria partícula. Observações recentes têm demonstrado que os radicais tocoferoxil formados pela metabolização do óxido nítrico têm, também, implicações importantes na oxidação da LDL e que a vitamina E pode ter um efeito proliferativo direto sobre a íntima (KEANEY et al., 1994).

No nosso trabalho, utilizamos 30mg/kg/dia de vitamina E. Esta dose - já o dissemos - corresponde a aproximadamente três vezes a dose máxima

recomendada para humanos. Conseqüentemente, o efeito pró-oxidante da vitamina E pode ter favorecido o crescimento intimal. Pela dificuldade em se determinar a atividade pró-oxidante da vitamina E, este efeito também não foi avaliado no nosso experimento.

Sem embargo, quaisquer que sejam as causas que expliquem os resultados discordantes observados com a vitamina E, parece que os antioxidantes sintéticos, o BHT e o probucol, têm sido mais efetivos no controle da reestenose pós-angioplastia. A fim de comparar a efetividade dos antioxidantes probucol e vitamina E na prevenção da reestenose, devemos analisar os resultados obtidos em um estudo publicado recentemente. Certamente, por se tratar de um trabalho randomizado, duplo-cego e com um bom número de pacientes, deste estudo é que obtemos os resultados mais confiáveis. Neste, foi avaliado o efeito das vitaminas E, C e A associadas e do probucol na reestenose de 317 pacientes submetidos à angioplastia. Os índices de reestenose observados, após seis meses, nos grupos de probucol e polivitamínico, foram, respectivamente, de 20,7% e de 40,3% ($p=0,003$). Visto que, aqui, a vitamina E também não modificou o curso da reestenose e que o grupo tratado com probucol teve o índice de reestenose de somente 21%, é possível que a vitamina E isoladamente não interfira no curso da reestenose, estando, neste sentido, de acordo com o resultado do nosso experimento.

5 CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

A partir dos nossos achados, podemos concluir que:

1. A terapêutica com acetato de DL α -tocoferol, na dose de 30mg/kg/dia, em coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica a 1%, não alterou os níveis de colesterol total, de HDL, LDL e de triglicerídeos.

2. A terapêutica com acetato de DL α -tocoferol, na dose de 30mg/kg/dia, não alterou a área neo-intimal pós-angioplastia no modelo experimental adotado por nós.

ANEXOS

ANEXO 1 - VALORES PLANIMÉTRICOS DAS LESÕES ARTERIAIS

Tabela 8 - Valores planimétricos das lesões (mm²) do Grupo A

Coelho - Lesão	Íntima (mm ²)	Média (mm ²)	Íntima ÷ média
1 - Dir. Prox.	0.37539	1.30180	0.28836
1 - Dir. Dist.	0.23507	0.75316	0.31211
1 - Esq. Prox.	0.24436	1.05480	0.23166
1 - Esq. Dist.	0.21973	0.82984	0.26479
2 - Dir. Prox.	0.09036	0.81480	0.11090
2 - Dir. Dist.	0.05564	0.38944	0.14287
2 - Esq. Prox.	0.09622	0.74556	0.12906
2 - Esq. Dist.	0.06738	0.43212	0.15593
3 - Esq. Prox.	0.12116	0.51824	0.25791
3 - Esq. Dist.	0.10451	0.38616	0.30011
3 - Dir. Prox.	0.12427	0.48184	0.23379
3 - Dir. Dist.	0.13079	0.42580	0.27064
4 - Esq. Prox.	0.14969	0.69444	0.14849
4 - Esq. Dist.	0.07312	0.44244	0.18239
4 - Dir. Prox.	0.11286	0.76004	0.21555
4 - Dir. Dist.	0.06746	0.36992	0.16489
5 - Esq. Prox.	0.16131	0.93412	0.21260
5 - Esq. Dist.	0.16286	0.79248	0.19998
5 - Dir. Prox.	0.23514	1.10600	0.17269
5 - Dir. Dist.	0.12852	0.64268	0.20677
6 - Esq. Prox.	0.19977	0.83500	0.17529
6 - Esq. Dist.	0.37764	0.63348	0.19050
6 - Dir. Prox.	0.14833	0.84620	0.23925
6 - Dir. Dist.	0.10923	0.57240	0.59614
7 - Esq. Prox.	0.25395	0.75844	0.27978
7 - Esq. Dist.	0.11831	0.44628	0.75697
7 - Dir. Prox.	0.22094	0.78968	0.33483
7 - Dir. Dist.	0.36592	0.48340	0.26510
8 - Esq. Prox.	0.14265	0.83524	0.15876
8 - Esq. Dist.	0.09057	0.51884	0.18298
8 - Dir. Prox.	0.15358	0.96740	0.17079
8 - Dir. Dist.	0.08468	0.46284	0.174580

Tabela 9 - Valores planimétricos das lesões (mm²) do Grupo B

Coelho - Lesão	Íntima (mm ²)	Média (mm ²)	Íntima ÷ média
9 - Esq. Prox.	0.07385	0.53480	0.11634
9 - Esq. Dist.	0.19707	0.92392	0.21330
9 - Dir. Prox.	0.18688	1.18328	0.15793
9 - Dir. Dist.	0.11647	0.64464	0.18067
10 - Esq. Prox.	0.21077	0.82360	0.25591
10 - Esq. Dist.	0.10138	0.49784	0.20364
10 - Dir. Prox.	0.12420	0.81276	0.15281
10 - Dir. Dist.	0.11304	0.54640	0.20684
11 - Esq. Prox.	0.09637	0.57176	0.16855
11 - Esq. Dist.	0.13114	0.38488	0.34076
11 - Dir. Prox.	0.08226	0.57532	0.14298
11 - Dir. Dist.	0.07901	0.44356	0.17813
12 - Esq. Prox.	0.16234	0.72708	0.22328
12 - Esq. Dist.	0.12370	0.45944	0.26901
12 - Dir. Prox.	0.25513	0.72424	0.35720
12 - Dir. Dist.	0.19053	0.52440	0.36333
13 - Esq. Prox.	0.19146	0.97032	0.19732
13 - Esq. Dist.	0.19533	0.84092	0.23228
13 - Dir. Prox.	0.30664	1.00404	0.30541
13 - Dir. Dist.	0.25936	0.86608	0.29946
14 - Esq. Prox.	0.18425	0.80548	0.22875
14 - Esq. Dist.	0.13169	0.59824	0.22013
14 - Dir. Prox.	0.14940	0.71608	0.20864
14 - Dir. Dist.	0.12817	0.45764	0.28007
15 - Esq. Prox.	0.13281	0.66252	0.20046
15 - Esq. Dist.	0.44096	0.45524	0.96863
15 - Dir. Prox.	0.17096	0.86016	0.19875
15 - Dir. Dist.	0.16029	0.59780	0.27085
16 - Esq. Prox.	0.18379	1.11620	0.16466
16 - Esq. Dist.	0.13175	0.58272	0.22611
16 - Dir. Prox.	0.12174	0.63384	0.19207
16 - Dir. Dist.	0.08974	0.38896	0.23072

ANEXO 2 - VALORES DA ANÁLISE BIOQUÍMICA

Tabela 10 - Valores (mg/dl) de Colesterol, HDL, LDL e Triglicerídeos do Grupo A

Coelho	Colesterol	HDL	LDL	Triglicerídeos
1.	2530	10	2428	46
2.	790	10	775	22
3.	670	10	638	17
4.	850	11	838	10
5.	1590	10	1559	103
6.	2120	10	2099	53
7.	1740	10	1718	58
8.	840	10	818	61

Tabela 11 - Valores (mg/dl) Colesterol, HDL, LDL e Triglicerídeos do Grupo B

Coelho	Colesterol	HDL	LDL	Triglicerídeos
9.	950	11	935	10
10.	1070	10	1056	21
11.	950	19	925	31
12.	2330	10	2292	142
13.	1450	10	1435	23
14.	2000	10	1972	89
15.	1040	10	1025	27
16.	1390	10	1377	16

ANEXO 3 - RESULTADOS ESTATÍSTICOS

QUADRO 1 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS VARIÁVEIS LEVANTADAS NOS GRUPOS TRATADO E CONTROLE

VARIÁVEIS	GRUPO TRATADO						
	Número	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Média Total ⁽¹⁾	32	0,2415	0,1289	0,0228	0,1109	0,7570	0,2097
Média Geral	08	0,2415	0,0890	0,0315	0,1347	0,4092	0,2318
Colesterol	08	1.391,25	703,82	248,8	670	2.530	1.220,00
HDL	08	10,12	0,35	0,12	10	11	10,00
LDL	08	1.359,12	684,97	242,2	638	2.428	1.198,50
Triglicerídio	08	47,50	28,99	10,25	10	103	49,50
Peso	08	2.256,25	774,80	273,9	1.550	3.450	1.800,00

VARIÁVEIS	GRUPO CONTROLE						
	Número	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Média Total ⁽¹⁾	32	0,2514	0,1467	0,0259	0,1163	0,9686	0,2167
Média Geral	08	0,2514	0,0778	0,0275	0,1671	0,4097	0,2210
Colesterol	08	1.397,50	516,99	182,8	950	2.330	1.230,00
HDL	08	11,25	3,15	1,11	10	19	10,00
LDL	08	1.377,12	510,07	180,3	925	2.292	1.216,50
Triglicerídio	08	44,88	46,28	16,4	10	142	25,00
Peso	08	2.387,50	936,46	331,1	1.650	3.900	1.775,00

(1) Refere-se a todos os dados levantados.

QUADRO 2 - RESULTADO DO TESTE APLICADO NA COMPARAÇÃO DO GRUPO TRATADO COM O GRUPO CONTROLE

VARIÁVEIS	RESULTADO DO TESTE	VALOR TABELADO	SIGNIFICÂNCIA
Média Total	- 0,287	p = 0,775	NS
Média Geral	- 0,237	p = 0,816	NS
Colesterol	- 0,023	p = 0,982	NS
HDL	- 1,008	p = 0,331	NS
LDL	- 0,060	p = 0,953	NS
Triglicerídio	0,136	p = 0,894	NS
Peso	- 0,307	p = 0,763	NS

NOTA: Resultado do teste obtido através do software "Primer of Biostatistic" com o teste "t de Student" utilizando o erro padrão.

QUADRO 2 - RESULTADO DO TESTE APLICADO NA COMPARAÇÃO DO GRUPO TRATADO COM O GRUPO CONTROLE

VARIÁVEIS	RESULTADO DO TESTE	VALOR TABELADO	SIGNIFICÂNCIA
Média Total	0,544	p = 0,587	NS
Média Geral	74,0	p > 0,06	NS
Colesterol	73,0	p > 0,06	NS
HDL	⁽¹⁾ - 1,004	p = 0,333	NS
LDL	73,0	p > 0,06	NS
Triglicerídio	61,0	p > 0,06	NS
Peso	71,0	p > 0,06	NS

NOTA: Resultado do teste obtido através do software "Primer of Biostatistic" com os testes "Mann-Whitney" e "t de Student" ⁽¹⁾.

ANEXO 4 - FIGURAS

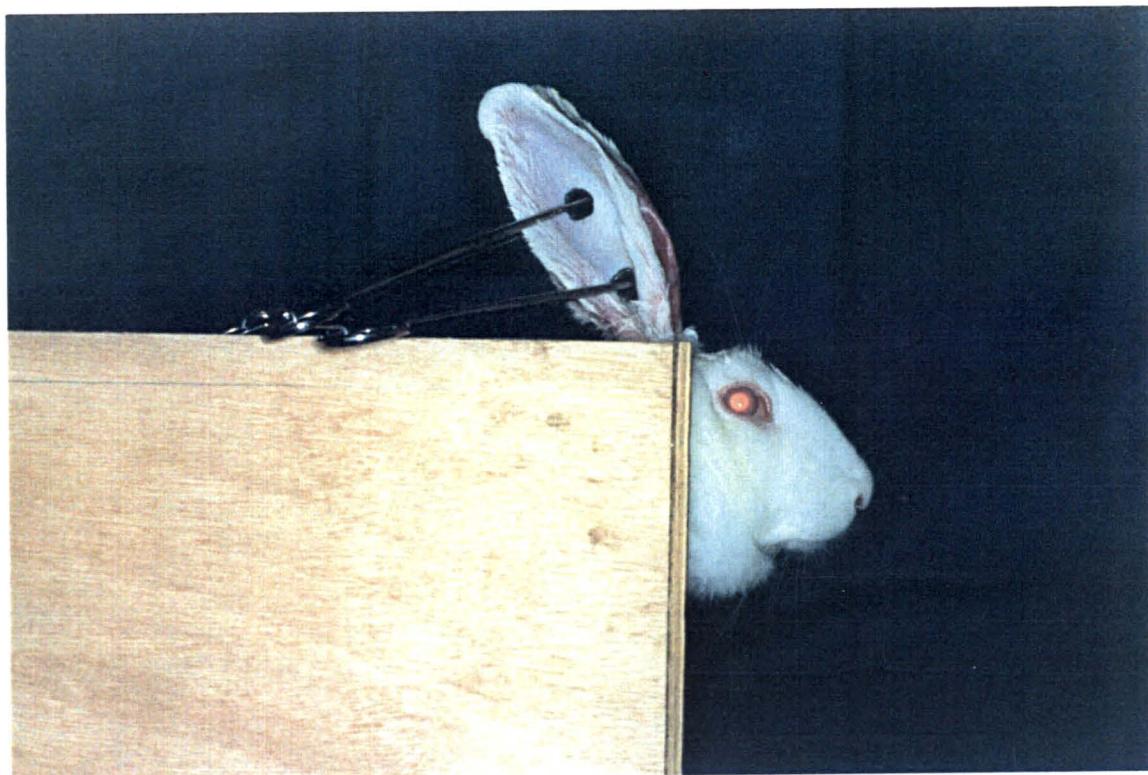


Figura 1. Coelho na caixa de fixação com as pinças comprimindo as artérias das orelhas.

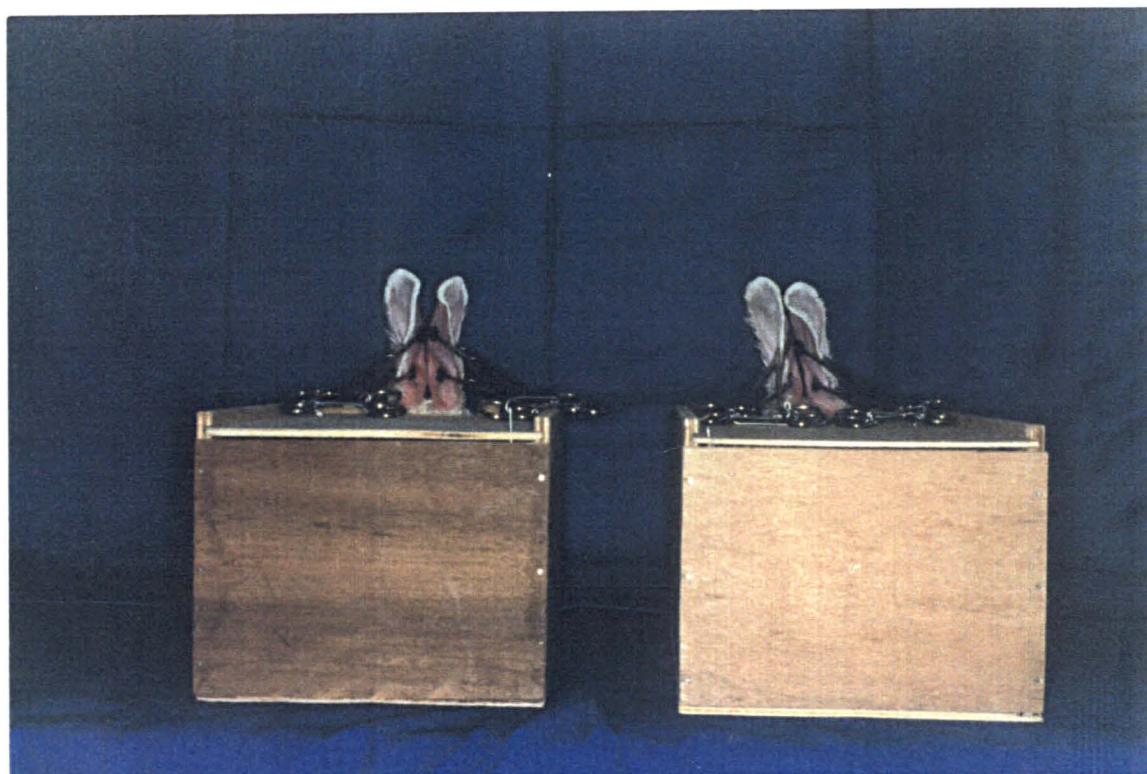


Figura 2. Visão posterior de dois coelhos nas caixas de fixação.

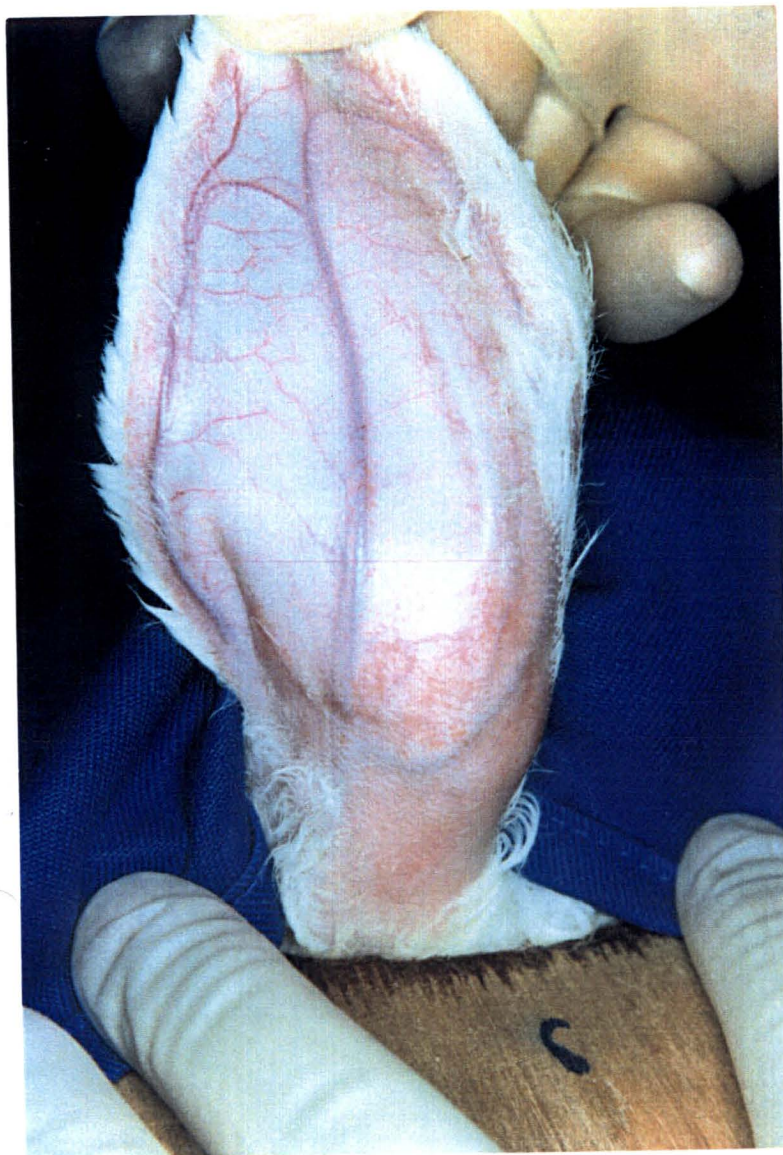


Figura 3. Região dorsal da orelha do coelho, permitindo a visualização da circulação.

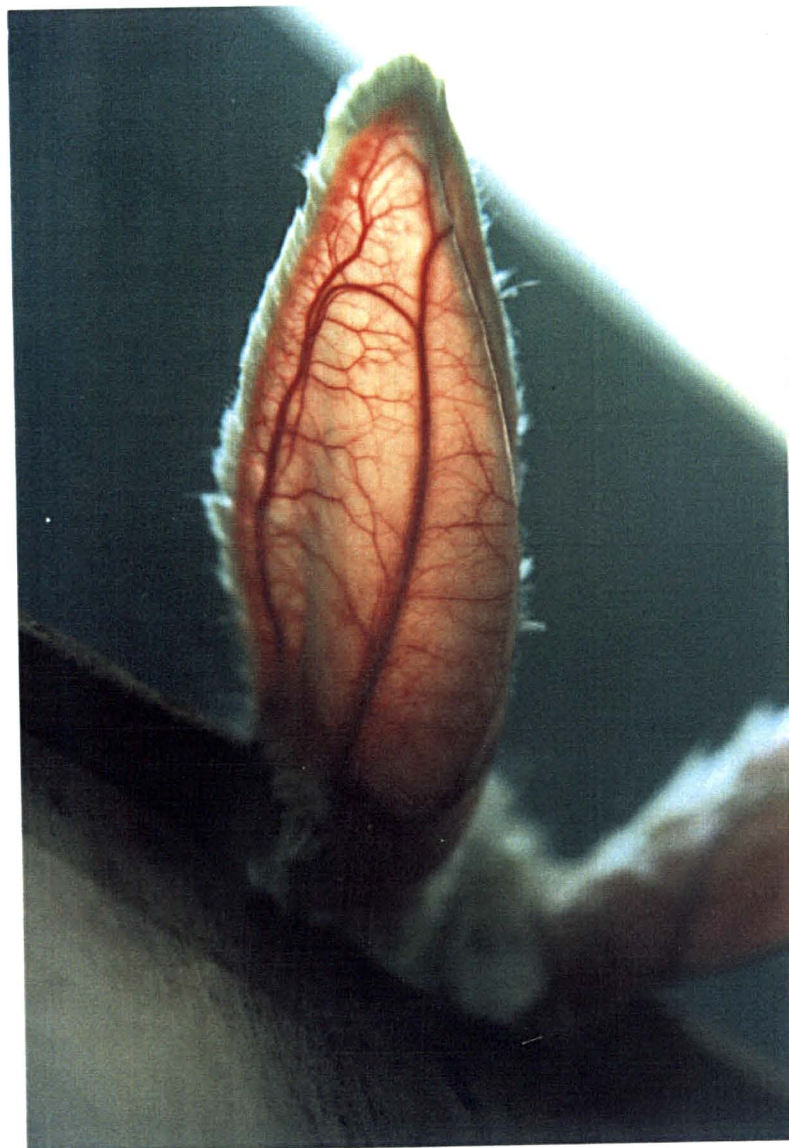


Figura 4. Visão dos vasos da orelha por transiluminação.

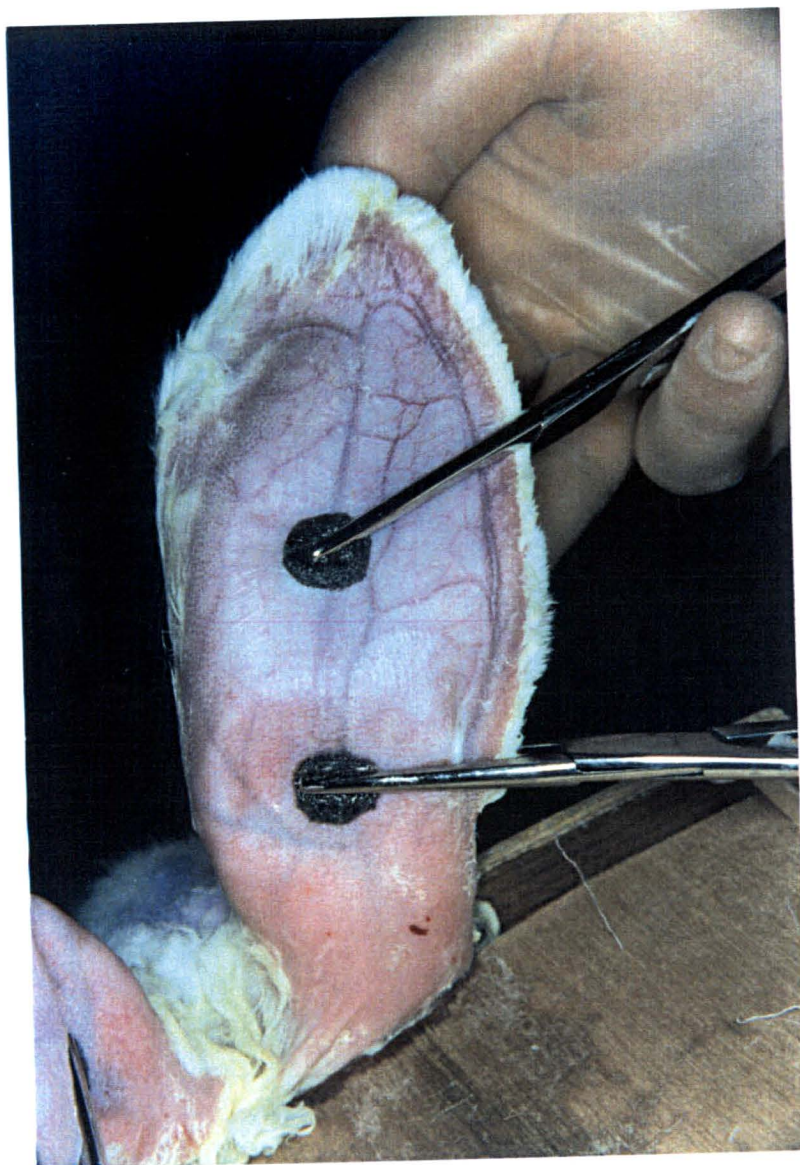


Figura 5. Pinças Kelly n. 16 comprimindo a artéria central da orelha em dois pontos (distal e proximal).

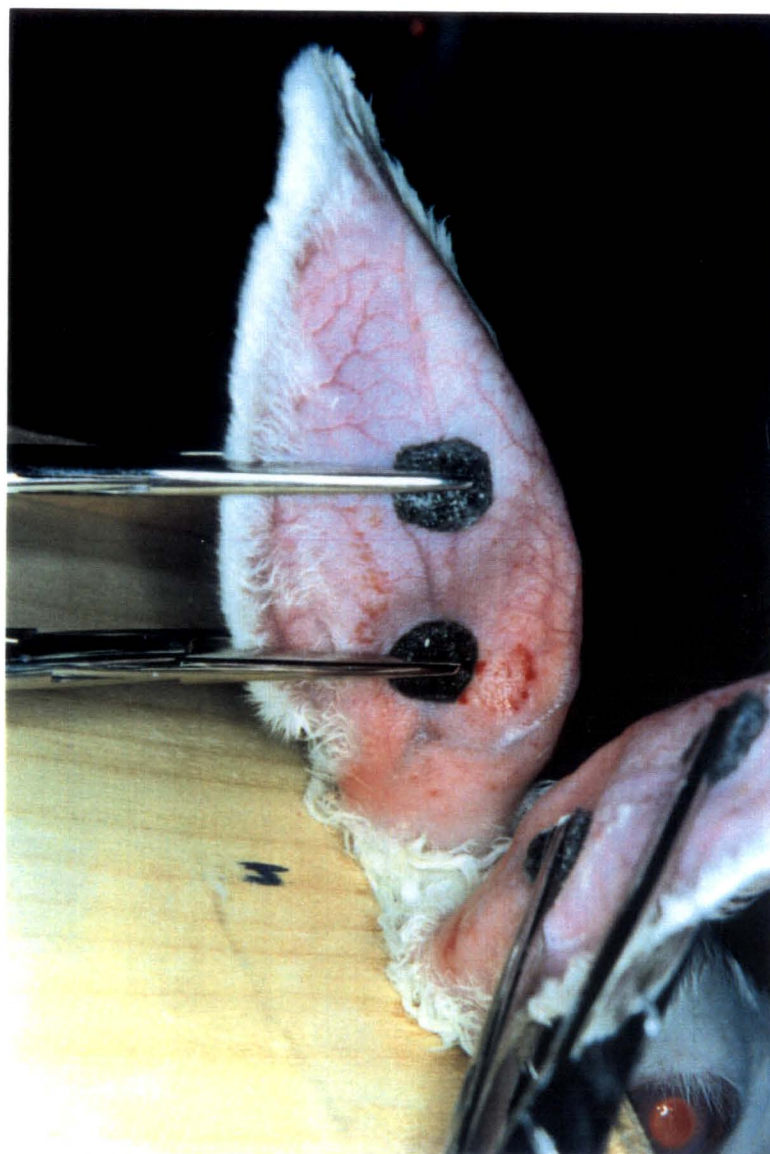


Figura 6. Pinças Kelly n. 16 comprimindo a artéria central da orelha em dois pontos (distal e proximal), passados 30 min. Observar os pontos hemorrágicos.

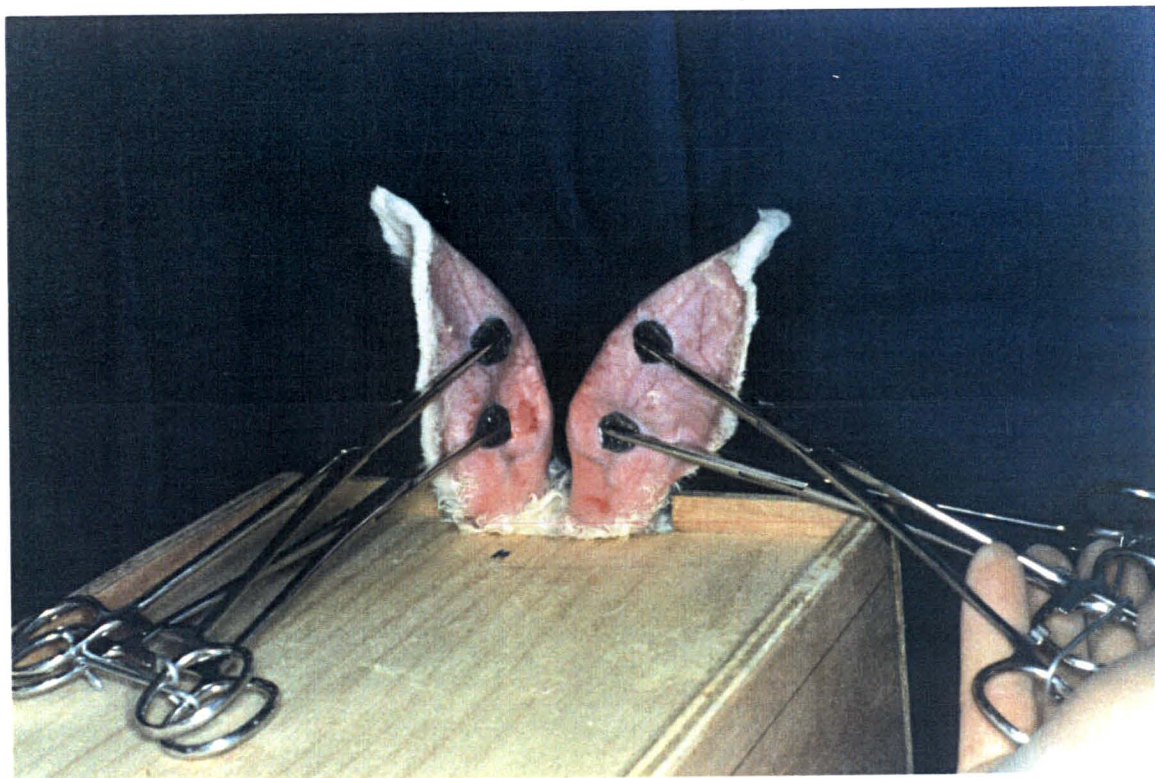


Figura 7. Pinças Kelly n. 16 comprimindo a artéria central da orelha em dois pontos (distal e proximal), passados 30 min. Observar os pontos hemorrágicos.

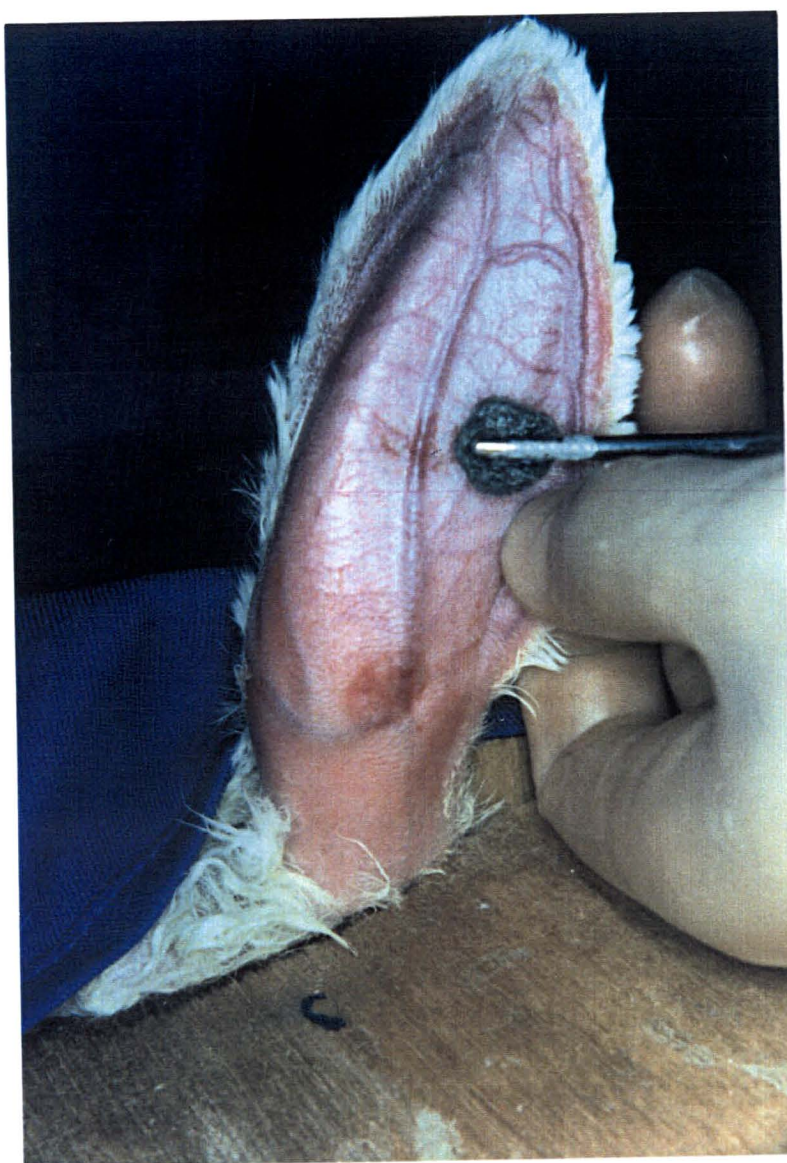


Figura 8. Pinça sendo retirada após 30 minutos de compressão.

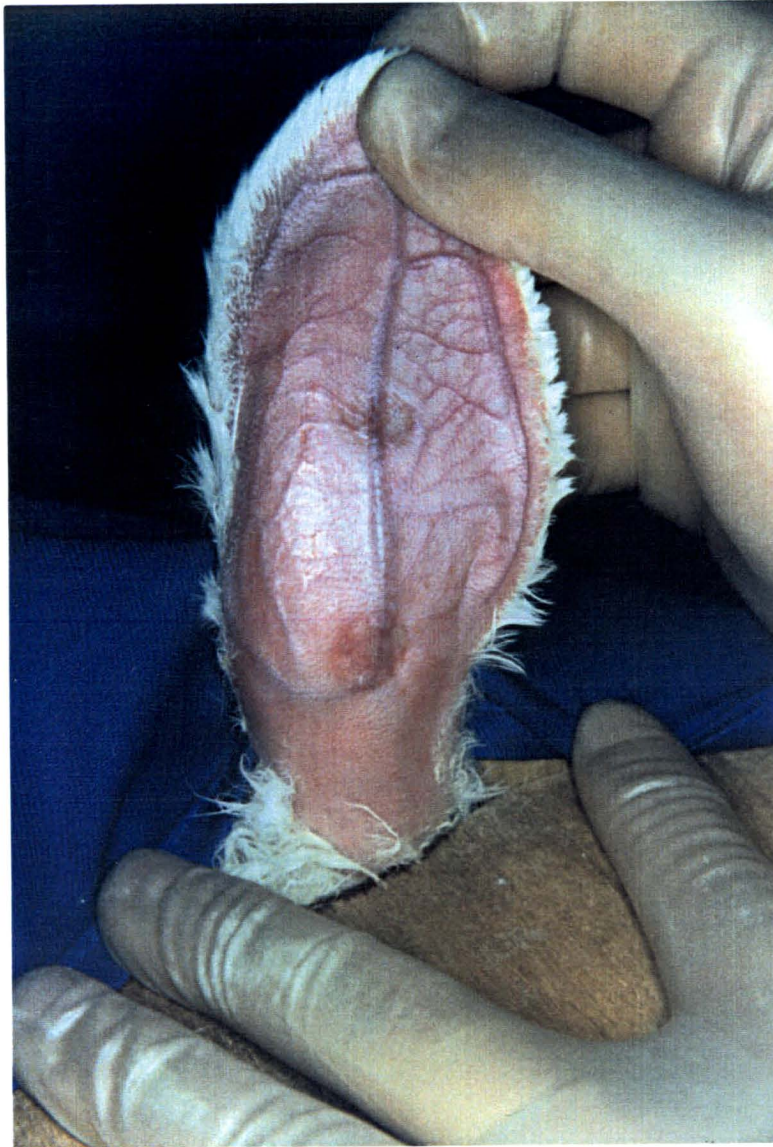


Figura 9. Aspecto do dorso da orelha após 30 minutos de compressão.

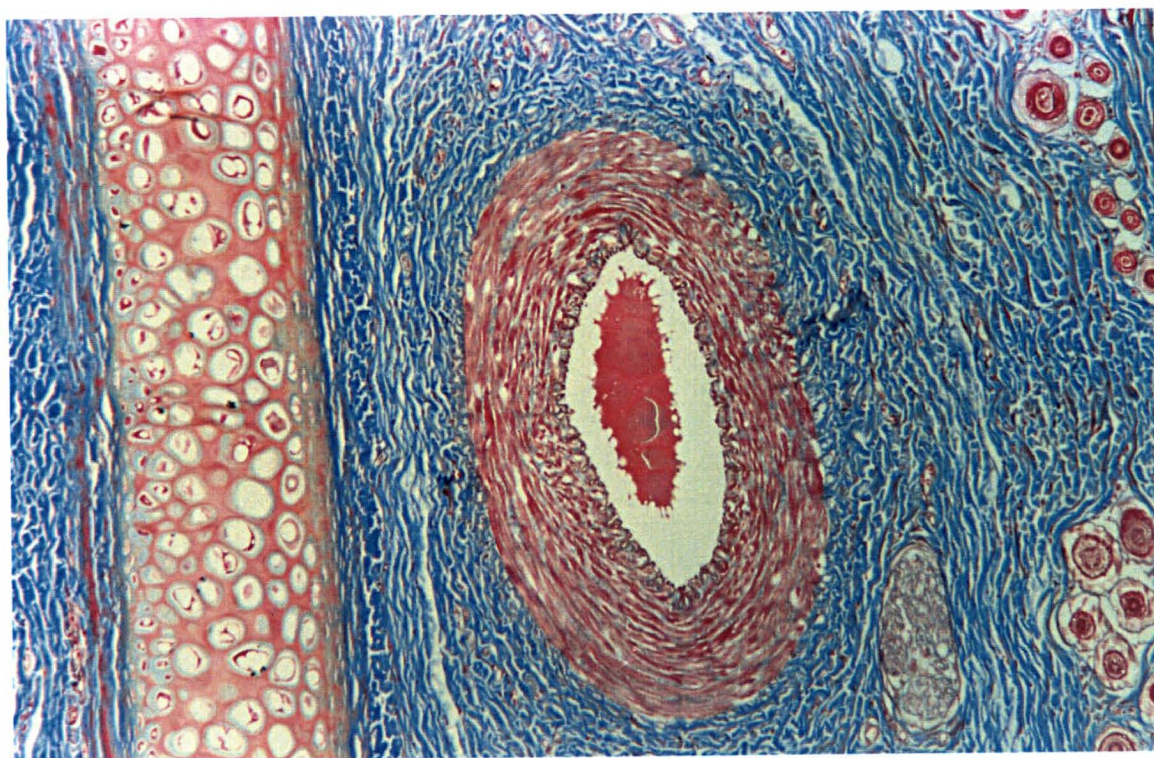


Figura 10. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do estudo piloto. (Tricrômico de Masson - 10x).

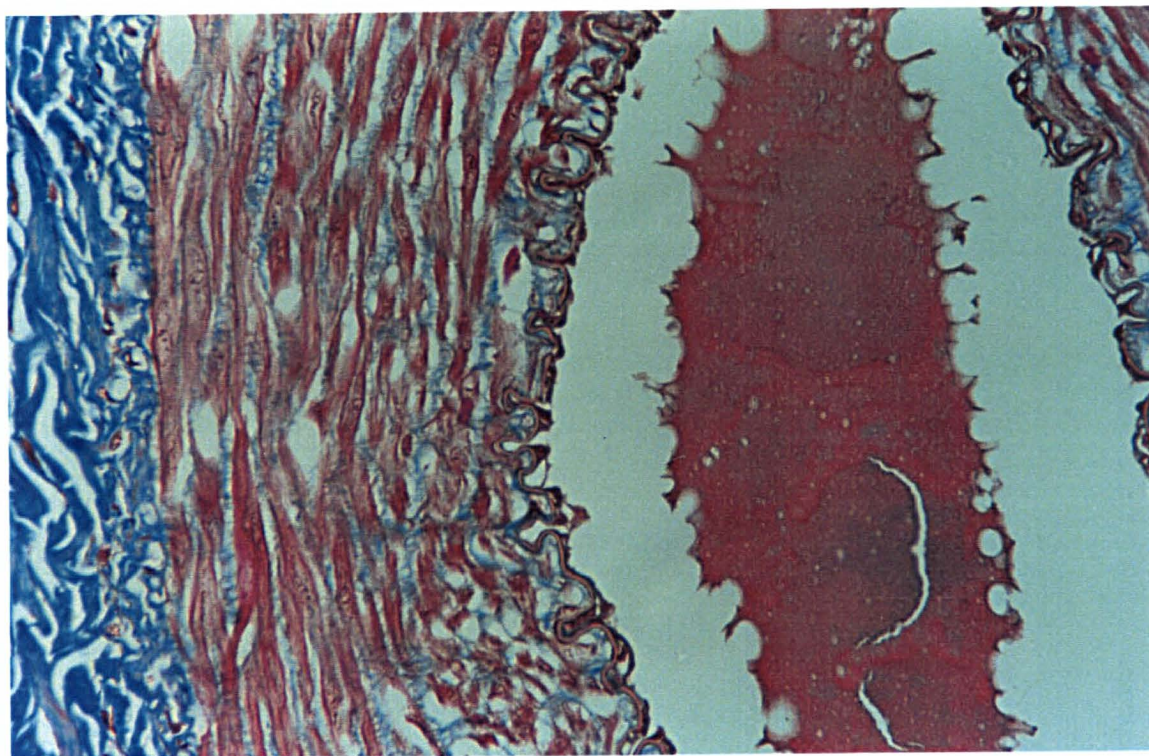


Figura 11. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do estudo piloto. (Tricrômico de Masson - 40x).



Figura 12. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do estudo piloto. (Van Gieson - 10x).

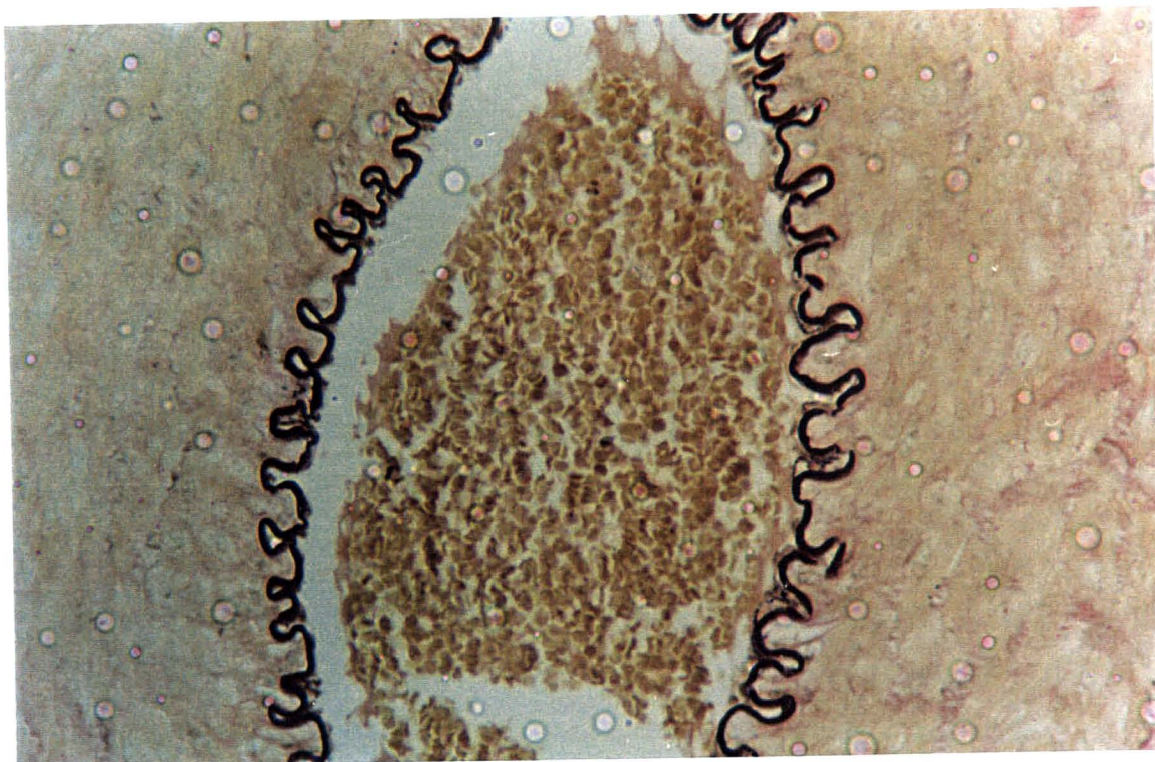


Figura 13. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do estudo piloto. (Van Gieson - 40x).

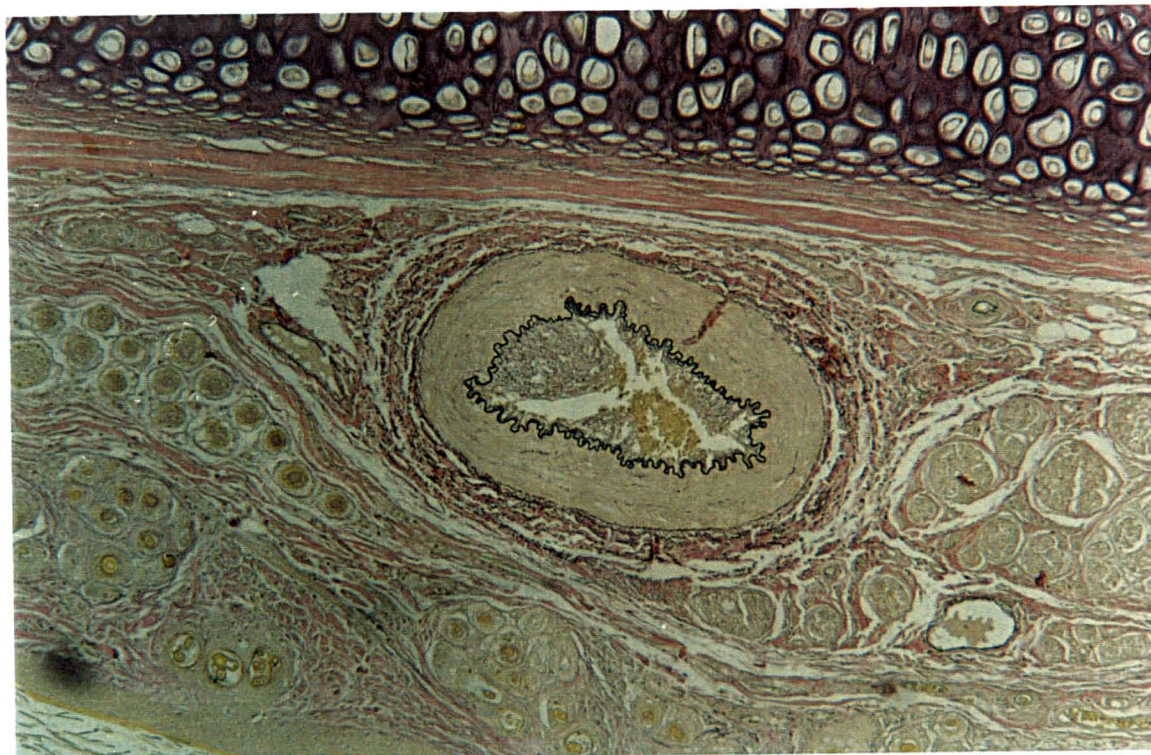


Figura 14. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do grupo controle (B). Observar a espessura da íntima. (Van Gieson - 10x).

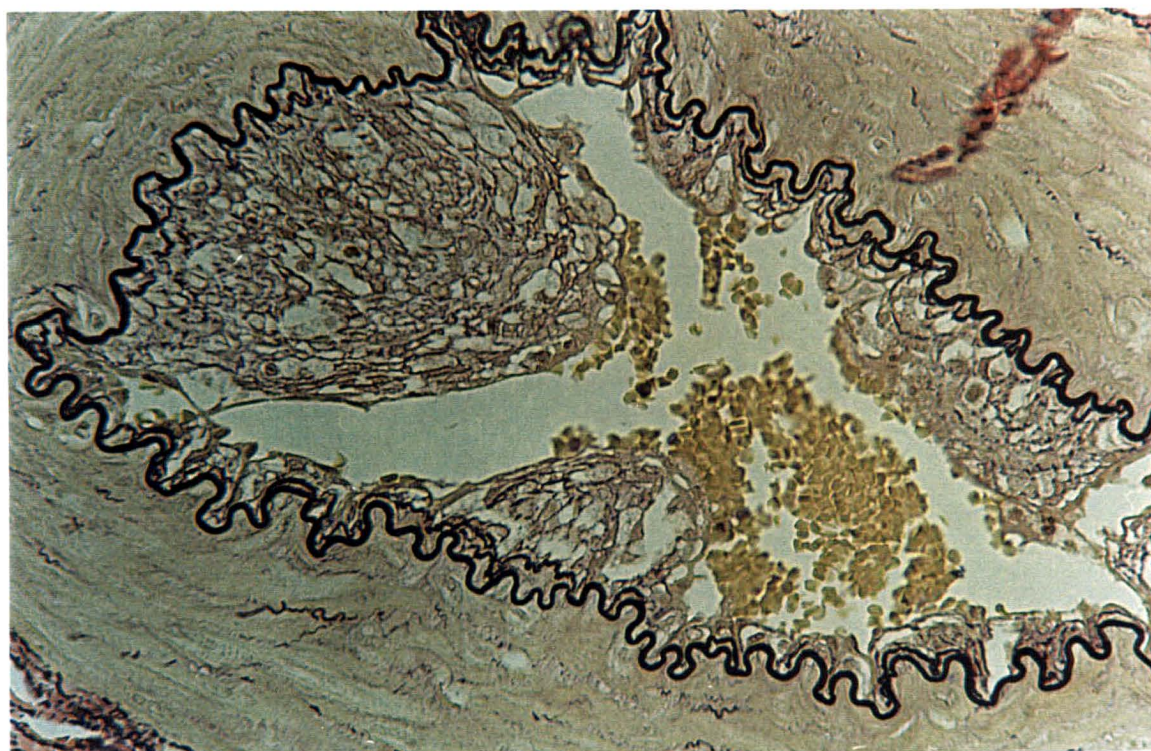


Figura 15. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do grupo controle (B). Observar a espessura da íntima. (Van Gieson - 40x).

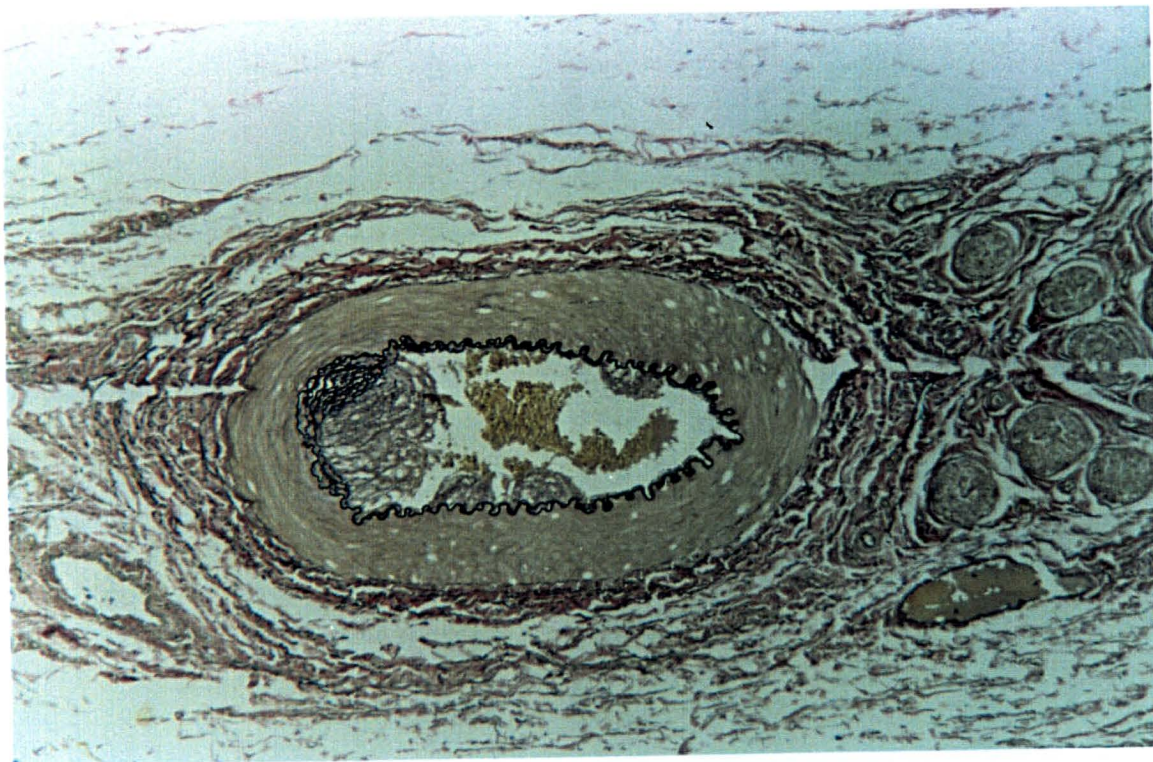


Figura 16. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do grupo controle (A). Observar o espessamento intimal focal. (Van Gieson-10x).

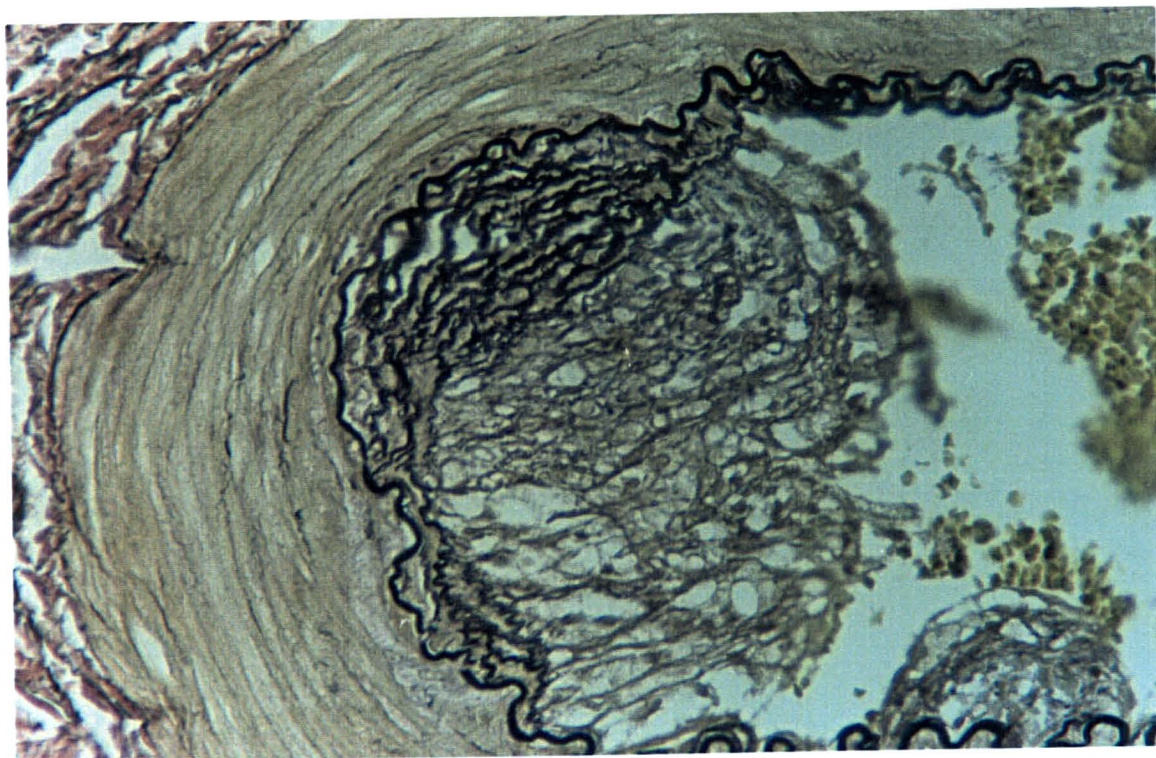


Figura 17. Fotomicrografia da artéria central da orelha do coelho. Animal do grupo controle (A). Observar o espessamento intimal focal. (Van Gieson-40x).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHMED W. H. & BITTL. J. A. Angioplastia Coronária com Laser-Excimer. **Clínicas Cardiológicas. Novas Técnicas Intervencionistas**. Rio de Janeiro, v. 4, P. 715-730, 1994.
2. AMELI, S.; KAUL, S.; CASTRO, L. et al. Effect of Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty on Circulating Endothelin Levels. **Am. J. Cardiol**. New York, v. 72, p. 1352-1356, dezembro 1993.
3. ANDERSON, T. J.; MEREDITH I. T.; YEUNG, A. C. et al. The Effect of Cholesterol-lowering and Antioxidant Therapy on Endothelium-dependent Coronary Vasomotion. **N. Engl. J. Med**. Boston, v. 332, n. 8, p. 488-493, fevereiro 1995.
4. ANNEX, B. H.; SKETCH M. H.; STACK R.S. et al. Aterectomia Coronariana por Extração Transluminal. **Clínicas Cardiológicas. Novas Técnicas Intervencionistas**. Rio de Janeiro, v. 4, P.627-638, 1994.
5. ASADA,Y.; KISANUKI A.; TSUNEYOSHI, A. et al. Effects of Inflation Pressure of Balloon Catheter on Vascular Injuries and Subsequent Development of Intimal Hyperplasia in Rabbit Aorta. **Atherosclerosis**, v. 121, p.45-53, 1996.
6. BADIMON J.J.; FUSTER, V.; CHESEBRO J. H. et al. Coronary Atherosclerosis a Multifactorial Disease. **Circulation**. Dallas, v. 87(sup.II), n. 3, p. II-3-II-16, março 1993.
7. BANAI, S.; SHOU M.; CORREA R. et al. Rabbit Ear Model of Injury-Induced Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation - Kinetics, Reproducibility, and Implications. **Circulation**. Dallas, v. 69, n. 3, p. 748-756, setembro 1991.
8. BURCHENAL, J. E. B.; KEANEY J. F. Jr.; CURRAN-CELENTANO, J. et al. The lack of Effect of β -carotene on Restenosis in cholesterol-fed Rabbits. **Atherosclerosis**, v. 123, p. 157-167, 1996.
9. CARAMORI, P.R.A.; YAMAMOTO G. I.; ZAGO, A.J. Reestenose Pós-Angioplastia. Fisiopatologia. **Arq. Bras. Cardiol**. Rio de Janeiro, v. 69, n. 2, p. 141-148, agosto 1997.

10. CARVALHO M. H. C.; SCIVOLETTO, R.; NIGRO, D. de. et al. Funções Fisiológicas do Endotélio Vascular. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 121-8, mar./abr. 1996
11. CHEESEMAN, K. H.; SLATER T. F. An Introduction to Free Radical Biochemistry. **British Med. Bull.** London, v. 49, n. 3, p. 482-493, julho 1993.
12. COFFEY, M.D.; COLE, R. A.; COLLES, S. M. et al. In Vitro Cell Injury by Oxidized Low Density Lipoprotein Involves Lipid Hydroperoxide-induced Formation of Alkoxyl, Lipid, and Peroxyl Radicals. **J. Clin. Invest.** v. 96, p. 1866-1873, outubro 1995.
13. DAUGHERTY, A. DUNN, J. L.; RATERI, D. L. et al. Myeloperoxidase, a Catalyst for Lipoprotein Oxidation, Is Expressed in Human Atherosclerotic Lesions. **J. Clin. Invest.**, v. 94. p. 437-444, julho 1994.
14. DAUGHERTY, A. & ROSECLAAR, S. E. Lipoprotein Oxidation as a Mediator of Atherogenesis: insights from Pharmacological Studies. **Cardiovasc. Res.** v. 29, p. 297-311, 1995.
15. DEMAIO S. J. et al. Vitamin E Supplementation, Plasma Lipids and Incidence of Restenosis after Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty (PTCA). **J. Am. Coll. Nutr.** v. 11, p. 68-73, 1992.
16. DOTTER, C. T. & JUDKINS, M. P. Transluminal Treatment of Atherosclerotic Obstruction: Description of a New Technique and a Preliminary Report of its Application. **Circulation.** v. 30, p. 654-670, 1964.
17. EHRENWALD, E.; CHISOLM, G.M.; FOX, P.L. Intact Human Ceruloplasmin Oxidatively Modifies Low Density Lipoprotein. **J. Clin. Invest.** v. 93, p. 1493-1501, abril 1994.
18. ELLIS, S.G. Elective Coronary Angioplasty: Technique and Complications. In: TOPOL, E.J. **Textbook of Interventional Cardiology**. Philadelphia: Saunders, 1994. p. 186-206.
19. ELLIS, S.G.; SAVAGE, M.; FISCHMAN, D. et al. Restenosis After Placement of Palmaz-Schatz Stents in Native Coronary Arteries. **Circulation**, Dallas, v. 86, p. 1836-1844, 1992.
20. ESTERBAUER, H.; WÄG G.; PUHL, H. Lipid Peroxidation and its Role in Atherosclerosis. **British Med. Bull.** London, v. 49, n. 3, p. 566-576, julho 1993.

21. FARUQI, R.; MOTTI, C. de la; DICORLETO, P.E. α -Tocopherol Inhibits Agonist-Induced Monocytic Cell Adhesion to Cultured Human Endothelial Cells. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 592-600, agosto 1994.
22. FLATHER, M.D.; FARKOUH M. E.; YUSUF, S. . Metanálise na Avaliação das terapias. In: JULIAN Desmond; BRAUNWALD, Eugene. **Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio**. Rio de Janeiro. Interlivros, 1996, P. 393-406.
23. FRANCISCHETTI, E. A.; FAGUNDES, V. G. de A.; FRANÇA, M. de F. Endotélio Vascular. Um importante Sistema Cibernético Vaso-modulador e Modulador cuja Disfunção Participa do Processo Hipertensivo. **Arq. Bras. Cardiol.**, Rio de Janeiro, V. 64, N. 1, 1995.
24. FREYSCHUSS, A.; STIKO-RAHM, A.; SWEDENBORG, J. et al. Antioxidant Treatment Inhibits the Development of Intimal Thickening after Balloon Injury of the Aorta in hypercholesterolemic Rabbits. **J. Clin. Invest.** , v. 91, p.1282-1288, abril 1993.
25. GERTZ, S.D.; GIMPLE, L.W.; BANAI, S. et al. Geometric Remodeling Is Not the Principal Pathogenetic Process in Restenosis After Balloon Angioplasty. **Circulation**, Dallas, v. 90, n. 6, p. 3001-3008, dezembro 1994.
26. GIBBONS, G. H. & DZAU, V.J. The Emerging Concept of Vascular Remodeling. **N. Engl. J. Med.** Boston, v. 330, n. 20, p. 1431-1438, maio 1994.
27. GLAGOV, S. Intimal Hyperplasia, Vascular Modeling, and the Restenosis Problem. **Circulation**, Dallas, v. 89, n. 6, p. 2888-2891, junho 1994.
28. GODFRIED, S.L. & DECKELBAUM, L. I. Natural Antioxidants and Restenosis after Percutaneous transluminal Coronary Angioplasty. **Am. Heart J.**, St. Louis, v. 129, n. 1, p. 303-210, janeiro 1995.
29. GRUENTZIG, A. Transluminal Dilatation of Coronary Artery Stenosis. **Lancet**. v. 1, p. 263, 1978.
30. HAMILTON, T. A.; MAJOR, J.A.; CHISOLM, G.M. The Effects of Oxidized Low Density Lipoproteins on Inducible Mouse Macrophage Gene Expression are Gene and Stimulus Dependent. **J. Clin. Invest.** v. 95, p. 2020-2027, maio 1995.
31. HANDIN, R. I. & LASCALZO, J. Hemostasia, Trombose, Trombólise e Doença Cardiovascular. In: BRAUNWALD, Eugene. **Tratado de Medicina Cardiovascular**. São Paulo. Roca. 1991. p. 1841-1865.

32. HANKE, H.; STROHSCHNEIDER, T.; OBERHOFF, M. et al. Time Course of Smooth Muscle Cell Proliferation in the Media of Arteries Following Experimental Angioplasty. **Circulation Res.** Dallas, v. 67, n. 3, p. 651-659, setembro 1990.
33. HEBERLAND, M.E. & SMITH, V.C. Modificações das lipoproteínas dependentes dos Peróxidos lipídicos na Aterosclerose. In: MOSLEN, T. M & SMITH, V. C. **Radicais Livres: Mecanismos de Lesão Tecidual**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. p. 45-64.
34. HENNEKENS, C.H.; BURNG, J.E.; MANSON, J.E. et al. Lack of Long-Term Supplementation with Beta Carotene on the Incidence of Malignant Neoplasms and Cardiovascular Disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 334, n. 18, p. 1145-1149, maio 1996.
35. HOPPE, G.; O'NEIL, J.; HOFF, H.F. Inactivation of Lysosomal Proteases by Oxidized Low Density Lipoprotein is Partially Responsible for its Poor degradation by Mouse Peritoneal Macrophages. **J. Clin. Invest.** v. 94, p. 1506-1512, outubro 1994.
36. ITOH, A.; MIYAZAKI, S.; NOGOGI, H. et al. Angioscopic Prediction of Successful Dilatation and of Restenosis in Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty. **Circulation**, Dallas, v. 91, n. 5, p. 1389-1396, março 1995.
37. KASTRATI, A.; SCHÖMIG, A.; DIETZ, R. et al. Time curse of restenosis During the First Year After Emergency Coronary Stenting. **Circulation**. Dallas, v. 87, p. 1498-1505, 1993.
38. KEANEY, J. F. Jr. et al. Dietary Probucol Preserves Endothelial Function in Cholesterol-fed Rabbits by Limiting Vascular Oxidative Stress and Superoxide Generation. **J. Clin. Invest.**, V. 95, p. 2520-2529, junho 1995.
39. KEANEY, J.F. Jr.; GAZIANO, J.M.; XU, A. et al. Low-dose α -Tocopherol Improves and Higt-Dose α -Tocopherol worsens Endothelial Vasodilator Function in Cholesterol-Fed Rabbits. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 844-851, fevereiro 1994.
40. KEANEY, J. F & VITA, J. A. Atherosclerosis, Oxidative Stress, and Antioxidant Protection in Endothelium-Derived Relaxing Factor Action. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 38. n. 2. p. 129-154, set./out. 1995.

41. KOSTADINIDIS, T. Reestenose Após Angioplastia. "Cicatrização Excessiva"? Diagnóstico, Manuseio e Perspectivas. **Arq. Bras. Cardiol.** Rio de Janeiro, v. 61, n. 1, Janeiro 1993.
42. KUSHI, L.H.; FOLSON, A.R.; PRINEAS, R.J. et al. Dietary Antioxidants and Death From Coronary Heart Disease in Postmenopausal Woman. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.334, n. 18, p. 1156-1162, maio 1996.
43. LAFONT, A.M.; CHAI, Y.; CORNHILL J.F. et al. Effect of Alpha-tocopherol on Restenosis after Angioplasty in a Model of Experimental Atherosclerosis. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 1018-1025, março 1995.
44. LAURINDO, F.R.M.; LUZ, P.L da; UINT, L. et al. Evidence for superoxide Radical-Dependent Coronary Vasospasm After Angioplasty in Intact Dogs. **Circulation**, Dallas, v. 83, n. 5, p. 1705-1715, maio 1991.
45. LAURINDO, F. R. M. & LUZ, P. L. da. Influência de Processos Redox na Reparação Vascular à Lesão. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**. São Paulo, V. 6, n. 2, p. 171-189, mar./abr. 1996.
46. LAURINDO, F.R.M. & LUZ, P. L. da. Endotélio: Funções Normais e Papel na Aterosclerose. In: **SOCESP CARDIOLOGIA - Atualização e Reciclagem**. Rio de Janeiro. Atheneu. 1994. p. 245-254.
47. LEHER, H.; FREI, B.; OLOFSSON M. et al. Protection From Oxidized LDL-Induced Leukocyte Adhesion to Microvascular and Macrovascular Endothelium In Vivo by Vitamin C but Not Vitamin E. **Circulation**, Dallas, v. 91. n. 5, p. 1525-1532, março 1995.
48. LIBBY, P.; SCHWARTZ, D.; BROGI, E. et al. A Cascade Model of Restenosis: A Special Case of Atherosclerosis Progression. **Circulation**. Dallas. v. 86(sup.III), n. 6, p. III-47 - III-52, dezembro 1992.
49. LIMA, V. C. de. & PORTUGUAL, O.P.I. Reestenose: situação atual. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 5, n. 5, p.596-608, set./out. 1995.
50. LIU, M.W.; ROUBIN, G.S.; KING III, S. B. Restenosis After Coronary Angioplasty - Potencial Biologic Determinants and Role of Intimal Hyperplasia. **Circulation**, Dallas, v. 79, n. 6, p. 1374-1387, junho 1989.
51. LOTUFO, P. A. Epidemiologia das Doenças Cardíacas no Brasil: Histórico, Situação Atual e Proposta de Modelo Teórico. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**. São Paulo, v. 6, n. 5, p. 541-547, set./out. 1996.

52. LUZ, P. L. da & CHAGAS, A.C.P. Lesão de reperfusão e o Papel dos Seqüestradores de Radicais Livres de Oxigênio. In: LOPES, Antônio C. **Clínica Médica Contemporânea**. São Paulo. Sarvier. 1993. p. 54-58.
53. LUZ, P. L. da.; SOLIMENE, M.C.; PILEGGI, F. et al. Regressão da Aterosclerose Humana. Mecanismos e Implicações Clínicas. **Arq. Bras. Cardiol.** Rio de Janeiro. v. 64, n. 1, p. 1-6, 1995.
54. LUZ, P. L. da.; UINT, L.; SERRANO, C.V. Jr.; PILRGGI, F. et al. Endotélio e Aterosclerose. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**. São Paulo, v. 6, n. 2, p. 160-170, mar./abr. 1996.
55. LUZ, P. L. da & SERRANO, C. V. Jr. Aspectos da Prevenção das Doenças Cardiovasculares com Antioxidantes. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**. São Paulo, v. 6, n. 8, p. 564-567, set./out. 1996.
56. MAIER, J. A. M.; BARENGHI, L.; BRADAMANTE, S. et al. Induction of Human Endothelial Cell Growth by Oxidized Low Density Lipoprotein. **Atherosclerosis**, v. 123. p. 115-121, 1996.
57. MARMUR, J. D.;ROSSIKHINA, M.; GUHA A. et al. Tissue Factor Is Rapidly Induced in Arterial Smooth Muscle after Balloon Injury. **J. Clin. Invest.**, V. 91, p. 2253-2259, maio 1993.
58. MORRIS, D. L.; KRITCHEVSKY, S.B.; DAVIS, C.E. Serum Carotenoids and Coronary Heart Disease. **JAMA**, v. 272, n. 18, p. 1439-1441, novembro 1994
59. MOSCUCCI, M. & MULLER, D. W.M. Restenosis. In: FREED, Mark et al. **The New Manual of Interventional Cardiology**. Michigan: Physicians'Press, 1996, p. 413-440.
60. NUNES, G. & SOUSA, J.E.M. Manuseio da reestenose depois da angioplastia. In: SOUSA, A. G. M. R. **SOCESP Cardiologia**. São Paulo. Atheneu. 1996. p. 308-317.
61. OHARA, Y.; PETERSON T.E.; HARRINSON, D.G. et al. Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 2546-2551, junho 1993.
62. OMENN, G.S.; GOODMAN, G.E.; THORMQUIST. M.D.; BALMES, J. et al. Effects of Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 334, n. 18, p. 1150-1155, maio 1996.

63. PRASAD, K. & KALRA, J. Oxygen Free Radicals and Hypercholesterolemic Atherosclerosis: Effect of Vitamin E. **Am. Heart. J.**, St. Louis, v.125, n. 4, p. 959-973, abril 1993.
64. RAKUGI, H.; KIM, D.; KRIEGER, J. et al. Induction of Angiotensin Converting Enzyme in the Neointima after Vascular Injury - Possible Role in Restenosis. **J. Clin. Invest.** v. 93, p. 339-346, janeiro 1993.
65. REAVEN, P.; SAMPATH, P.; GRASSE, B.J. et al. Effects of Oleate-rich and Linoleate-rich Diets on the Susceptibility of Low Density Lipoprotein to Oxidative Modification In Mildly Hypercholesterolemic Subjects. **J. Clin. Invest.** v. 91, p. 668-676, fevereiro 1993.
66. REIDY, M.A.; FINGERLE, J.; LINDNER, V. Factors Controlling the Development of Arterial Lesions After Injury. **Circulation**. Dallas. v. 86(sup. III), n. 6, P. III-43 - III-46, dezembro 1992.
67. REISMAN M. & BUCHBINDER, M. Ablação Rotatória: O Cateter de Rotablator®. In: DEAN L. S.; ROUBIN G. S. **Clínicas Cardiológicas**. Interlivros. Rio de Janeiro, 1994. P. 715-730.
68. RIM, E. B.; STAMPFER M.J.; ASCHERIO, A. et al. Vitamin E Consumption and Risk of Coronary Heart Disease In Man. **N. Engl. J. Med.** Boston, v. 328, n. 20, p. 1450-1456, maio 1993.
69. ROSS, Russell. The Pathogenesis of Atherosclerosis. In: BRAUNWALD, Eugene. **Heart Disease - A Textbook of Cardiovascular Medicine**. Philadelphia. Saunders. 1997. p.1105-1125.
70. ROSS, R. & GLOMSET, J. A. The Pathogenesis of Atherosclerosis. **N. Engl. J. Med.** Boston, v. 295, n. 7, p. 369-377, agosto 1976.
71. SANTANAM, N. & PARTHASARATHY, S. Paradoxical Actions of Antioxidants in the Oxidation of Low Density Lipoprotein by Peroxidases. **J. Clin. Invest.** v. 95, p. 2594-2600, junho 1995.
72. SAREMBOCK, I.J.; LAVEAU, P.J.; SIGAL, S.L. et al. Influence of Inflation Balloon Size on the Development of Intimal Hyperplasia After Balloon Angioplasty. **Circulation**, Dallas, v. 80, n. 4, p. 1029-1039, outubro 1989.
73. SASAHARA, M.; RAINES E. W., CHAIT A. et al. Inhibition of Hypercholesterolemia-induced Atherosclerosis in the Nonhuman Primate by Probucol. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 155-164, julho 1994.

74. SCHWARTZ, C. J. et al. A Modern View of Atherosclerosis. **Am. J. Cardiol.**, Denver, v. 71, n. 6, p. 9B-14B, fevereiro 1993.
75. SCHWARTZ, R.S. Animal Models of Human Coronary Restenosis. In: TOPOL, E.J. **Textbook of Interventional Cardiology**. Philadelphia: Saunders, 1994. p. 365-381.
76. SCHWARTZ, S. M.; BLOIS, D. de; O'BRIEN, E.R.M. The Intima - Soil for Atherosclerosis and Restenosis. **Circulation Res.** Dallas, v. 77, n. 3, p. 445-465, setembro 1995.
77. SCOTT-BURDEN, T. & VANHOUTTE, P M. The Endotelium as a Regulator of Vascular Smooth Muscle Proliferation. **Circulation**. Dallas. v. 87(sup.V), n. 5, p. V-51 - V-55, maio 1993.
78. SERRUYS P.W. **Handbook of Coronary Stents**. Martin Dubitz. London. 1997.
79. SERRUYS, P.W.; LUIJTEN, H.E.; BEATT, R. et al. Incidence of Restenosis after Successful Coronary Angioplasty: a time-related phenomenon. **Circulation**, Dallas, v. 70, n. 2, p. 361-371, fevereiro 1988.
80. SHAISH, A.; DAUGHERTY, A.; O'SULLIVAN, F. et al. Beta-carotene Inhibits Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Rabbits. **J. Clin. Invest.**, v. 96. p. 2075-2082, outubro 1995.
81. SMITH, V. C. Radicais Livres: Mecanismos de Lesão Tecidual. In: MOSLEN, T. M.; SMITH, V. C. **Radicais Livres: Mecanismos de Lesão Tecidual**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. p. 1-22.
82. STAMPFER, M.J.; HENNEKENS C.H.; MANSON, J.E. et al. Vitamin E consumption and the Risk of Coronary Disease in Woman. **N. Engl. J. Med.** Boston, v. 328, n. 20, p. 1444-1449, maio 1993.
83. STEPHENS N.G. et al. Randomized Controlled Trial of Vitamin E in Patients With Coronary Disease. **Lancet**. London, v. 347, P. 860-872, 1995.
84. TANAJURA, L.F.L.; MATTOS, L.A.P.; FERES, F. et al. Angioplastia Coronária e Novas Intervenções não Cirúrgicas no Tratamento da Insuficiência Coronária. In: **SOCESP CARDIOLOGIA Atualização e Reciclagem**. Atheneu. Rio de Janeiro. p. 330-345. 1994.
85. TANQUAY J. F.; ZIDAR, J.P.; PHILLIPS III, H.R. et al. Estado Atual dos Stents Biodegradáveis. **Clínicas Cardiológicas. Estado Atual dos Stents biodegradáveis**. Rio de Janeiro, v. 4, P. 715-730, 1994.

86. TARDIF, J.; CÔTÉ, G.; LESPÉRANCE, J. et al. Probucol and Multivitamins in the Prevention of restenosis After Coronary Angioplasty. **N. Engl. J. Med.** Boston, v. 337, n. 6, p. 365-372, agosto, 1997.
87. TREASURE, C. B.; KLEIN, L.; WEINTRAUB, W.S. et al. Beneficial Effects of Cholesterol-lowering Therapy on the Coronary Endothelium in Patients with Coronary Artery Disease. **N. Engl. J. Med.** Boston, v. 332, n. 8, p. 481-487, fevereiro 1995.
88. UCHIDA, K.; SASAHARA, M.; MORIGAMI, N. et al. Expresson of platelet-Derived Growth Factor B-chain in Neointimal Smooth Muscle Cells of Balloon Injured Rabbit Femoral Arteries. **Atherosclerosis**, v. 124, p. 9-23, 1996.
89. YOKOI, H.; DAIDA, H.; KAWABARA, Y. et al. Effectiveness of Antioxidant in Preveting Restenosis After Percutaneus Transluminal Coronary Angioplasty: The Probucol Angioplasty Restenosis Trial. **J. Am. Coll. Cardiol.** v. 30, n. 4, p. 855-862, outubro, 1997.
90. YUAN, X.M.; LI, W.; OLSSON, A.G., BRUNK, U. T. Iron in Human Atheroma and LDL Oxidation by Macrophages Following Erytrophagocytosis. **Atherosclerosis**, v. 124. p. 61-73, 1996.
91. ZEYMER, U.; FISHBEIN, M. FORRESTER, J.S. et al. Proliferating Cell Nuclear Antigen Immunohistochemistry in Aorta After Balloon Denudation. **Am. J. Pathol.** v. 141, n. 3, p. 685-690, setembro 1992.